

ZUR PHOTOREGULATION DER
GENEXPRESSION
IN DIFFERENZIERENDEN
PLASMODIEN VON
PHYSARUM POLYCEPHALUM

Harald Putzer

Diss
München
1984

**ZUR PHOTOREGULATION DER GENEXPRESSION
IN DIFFERENZIERENDEN PLASMODIEN
VON *PHYSARUM POLYCEPHALUM***

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Harald Putzer
München 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst L. Winnacker

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

Ein Teil der hier vorgelegten Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht:

Putzer, H., Werenskiold, K., Verfürth, C. & Schreckenbach, Th. (1983) Blue light inhibits slime mold differentiation on the mRNA-level;
EMBO J. 2, 261-267.

Putzer, H., Werenskiold, K., Verfürth, C., Claviez, M. & Schreckenbach, Th. (1984) Photomorphogenesis in *Physarum*: Induction of tubulins, sporulation-specific proteins and their mRNA's;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (im Druck)



Aufnahme: M. Claviez

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG	7
1. Das Konzept der differentiellen Genexpression	7
2. Der Einfluß von Licht auf die Genexpression	12
3. Der Myxomycet <i>Physarum polycephalum</i> als Modellsystem zum Studium lichtregulierter Genexpression	14
3.1 Der Lebenszyklus von <i>Physarum polycephalum</i>	14
3.2 Die Sphärulation	17
3.3 Die Sporulation	19
4. Problemstellung	22
III. ERGEBNISSE	24
1. Der Einfluß von Blaulicht auf die Genexpression in hungrigen Mikrop lasmodien	24
1.1 Proteinsynthese <u>in vivo</u>	24
1.1.1 <u>In vivo</u> Pulsmarkierung mit [³⁵ S]-Methionin und Analyse der Produkte durch zweidimensionale Gelelektrophorese	24
1.1.2 Isolierung und Charakterisierung von Zellwandproteinen aus Sphärulen	27
1.2 RNA-Synthese <u>in vivo</u>	29
1.2.1 Kontinuierliche Markierung mit [³ H]Uridin	29
1.2.2 Pulsmarkierung mit [³ H]Uridin	30
1.3 Untersuchung des Blaulichteffekts auf mRNA-Ebene	33
2. Die lichtinduzierte Sporulation und damit verbundene Veränderungen der Genexpression	38
2.1 Analyse der im Verlauf der Sporulation <u>in vivo</u> synthetisierten Proteine	38
2.1.1 Identifizierung von zwei während der Sporulation induzierten Proteinen als Tubuline	40
2.2 Induktion sporulationsspezifischer mRNA-Spezies	43

2.2.1	Isolierung und zellfreie Translation von RNA aus morphologisch definierten Stadien der Sporulation	43
2.2.2	Anreicherung sporulationsspezifischer mRNA-Spezies	45
2.2.3	Analyse der <u>in vitro</u> Translationsprodukte durch zweidimensionale Gelelektrophorese	47
2.2.4	Identifizierung der <u>in vitro</u> Translationsprodukte 10 und 15 als Tubuline	52
2.3	Untersuchung der Regulation einer sporulationsspezifischen mRNA-Spezies mit einer clonierten cDNA als Hybridisierungsprobe	56
2.3.1	Synthese einer sporulationsspezifischen cDNA	56
2.3.2	Identifizierung des cDNA-Clons 38 durch hybridselektionierte <u>in vitro</u> Translation	59
2.3.3	"Northern blot" Analyse mit Plasmid 38 als Hybridisierungsprobe	61
2.3.4	Untersuchungen zur Organisation des für das Protein 11 codierenden Gens im Chromosom	63
2.3.5	Analyse des für Protein 11 codierenden Gens mit Hinsicht auf DNA-Methylierung	66
IV.	DISKUSSION	72
V.	MATERIAL UND METHODEN	82
1.	Materialien	82
1.1	Chemikalien	82
1.2	Enzyme	83
1.3	Sonstige Materialien	83
1.4	Allgemein verwendete Reagenzien und Puffer	84
1.5	Stämme der verwendeten Organismen	84
2.	Kulturbedingungen	85
2.1	Medien für <i>Physarum</i>	85
2.2	Medien für <i>E. coli</i>	85

III

2.3	Züchtung von Mikroplasmodien, Induktion der Sphärulation und Belichtung der Plasmodien	86
2.4	Makroplasmodien, Induktion der Sporulation	87
3.	<u>In vivo</u> Markierung, Extraktion und Identifizierung von Plasmodienproteinen	87
3.1	Mikroplasmodien	87
3.2	Makroplasmodien	88
3.3	Identifizierung von Tubulinen	88
4.	Isolierung und Charakterisierung von Zellwandproteinen aus Sphärulen	90
5.	Messung der <u>in vivo</u> RNA-Synthese	90
6.	Isolierung und <u>in vitro</u> Translation von mRNA	91
6.1	Guanidiniumrhodanid-Extraktion von RNA	91
6.2	RNA-Anreicherung nach der Phenolmethode	93
6.3	Anreicherung von poly(A)-RNA durch Affinitätschromatographie	94
6.4	<u>In vitro</u> Translation im Retikulozytensystem	95
7.	Identifizierung <u>in vitro</u> translatierter Proteine als Tubuline	96
8.	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	96
9.	Protein - Gelelektrophorese	97
9.1	SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese	97
9.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	99
9.3	Fluorographie von radioaktiv markierten Proteinen und Auswertung der Fluorogramme	102
10.	Synthese eines sporulationsspezifischen cDNA Clons	103
10.1	cDNA Synthese, Einbau in das Plasmid pBR 322 und Transformation von E. coli	103
10.1.1	Synthese des ersten cDNA Stranges	103
10.1.2	Synthese des zweiten cDNA Stranges (ds-cDNA) und Abbau des "Hairpinloops"	105

10.1.3	Anfügen von homopolymeren Enden ("Tailing") an die ds-cDNA, das Plasmid pBR 322 und Durchführung der Homopolymerligation.	107
10.1.4	Transformation von E. coli	108
10.2	Selektion eines sporulationsspezifischen Clons	109
10.2.1	Koloniehybridisierung mit endmarkierter poly(A)-RNA	109
11.	Isolierung von Plasmiden	112
11.1	Miniplasmidpräparation	112
11.2	Plasmidisolierung im großen Maßstab	113
12.	Charakterisierung sporulationsspezifischer cDNA-Clone	114
12.1	Restriktionsanalyse	114
12.2	<u>In vitro</u> Translation hybrid-selektionierter mRNA-Spezies	114
13.	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	116
13.1	RNA-Elektrophorese im sauren Agarose- Harnstoffgel	116
13.2	RNA-Elektrophorese im Formaldehyd-Agarosegel	117
13.3	Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese von DNA	118
13.4	DNA-Elektrophorese im alkalischen Agarosegel	119
14.	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Physarum polycephalum</i>	119
14.1	Isolierung von Kernen	120
14.2	DNA-Isolierung aus Kernen	121
14.3	DNA-Bestimmung mit Diphenylamin	121
15.	Hybridisierung von an Nitrocellulose gebundenen Nukleinsäuren	122
15.1	Bindung von RNA an Nitrocellulose ("Northern blot")	122
15.2	Transfer von DNA auf Nitrocellulose ("Southern blot")	123

15.3	Radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation	124
15.4	Autoradiographiebedingungen für ^{32}P	125
VI.	LITERATUR	126
VII.	ABKÜRZUNGEN	136

I. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei lichtregulierte Differenzierungsreaktionen des azellulären Schleimpilzes *Physarum polycephalum* (Sphärulation und Sporulation) wurden mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden untersucht. Die Sphärulation ist ein durch Hunger induzierter, reversibler Prozeß, der durch blaues Licht gehemmt wird. Die Sporulation ist ein irreversibler, durch Licht induzierbarer Entwicklungsvorgang.

1. Die Hemmung der Sphärulation durch Blaulicht

Die in belichteten und differenzierenden Plasmodien (Kontrolle) synthetisierten Proteine wurden in vivo radioaktiv markiert und mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert. Während der ersten 8 h nach dem Transfer auf Hungermedium konnten keine Unterschiede im Proteinsynthesemuster zwischen belichteten und Kontrollplasmodien festgestellt werden. Während in den dunkel-inkubierten Plasmodien im Verlauf der zweiten Markierungsphase (16-32 h) mindestens 20 Proteinspezies induziert wurden, blieb in den belichteten Plasmodien das für den Hungerzustand charakteristische Synthesemuster erhalten. Es konnten lediglich 3 durch Licht induzierte Proteine nachgewiesen werden.

Da die Bildung einer stabilen Zellwand die morphologisch auffälligste Veränderung während der Sphärulation ist, wurden die Zellwandproteine aus reifen Sphärulen isoliert, zweidimensional aufgetrennt und mit den in vivo markierten Produkten aus differenzierenden Zellen verglichen. Drei der am stärksten markierten Proteine waren demnach bezüglich ihres isoelektrischen Punktes und Molekulargewichts mit

isolierten Zellwandproteinen identisch.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Belichtungsbeginn wurden RNA-Syntheseraten gemessen. Dabei stellte sich heraus, daß die Gesamt-RNA-Synthese 3 h nach Belichtungsbeginn um etwa 60 % stimuliert wurde. Diese erhöhte RNA-Synthese war transientser Natur und erreichte nach 12 h wieder das Niveau der Kontrollplasmodien. Sie könnte eine verstärkte Synthese ribosomaler RNA reflektieren, die in belichteten Plasmodien dazu dient, die bisher synthetisierten Proteine auch unter Hungerbedingungen weiter zu produzieren.

Die licht-abhängige Regulation spezifischer mRNA-Moleküle wurde durch in vitro Translationsexperimente untersucht. Dazu wurde die RNA aus belichteten und Kontrollplasmodien zu verschiedenen Inkubationszeiten extrahiert, gereinigt und im heterologen Reticulocytensystem in vitro translatiert. Die Translationsprodukte wurden in einem zweidimensionalen Gelsystem analysiert. Wie beim in vivo Markierungsexperiment konnte auch hier in Probe und Kontrolle keine Veränderung der Genexpression während der ersten 8 h festgestellt werden. Bis zum Ende der Morphogeneseperiode waren in den Kontrollplasmodien jedoch mindestens 26 translatierbare mRNA-Spezies induziert oder in ihrer Synthese stark erhöht, die in belichteten Plasmodien nicht auftraten. Zwei dieser Translationsprodukte waren nach elektrophoretischen Kriterien mit isolierten Zellwandproteinen identisch. Zahlreiche für das Plasmodienstadium typische mRNA-Spezies, darunter die mRNA des Aktins waren im Verlauf der Differenzierung durch in vitro Translation nicht oder nur mehr schwach nachweisbar. In belichteten Zellen wurden bis 25 h nach Belichtungsbeginn lediglich 2 mRNA-Spezies spezifisch induziert, und im wesentlichen das für die anfängliche Hungerperiode charakteristische in vitro Translationsmuster beibehalten. Trotz der geringen qualitativen Übereinstimmung zwischen in vitro und in vivo

synthetisierten Produkten weist die zeitliche und zahlenmäßige Korrelation eindeutig darauf hin, daß das Licht die Differenzierung auf mRNA-Ebene blockiert, wahrscheinlich über eine Regulation der Transkription oder des Processing der entsprechenden RNA-Moleküle.

2. Die Sporulation

Dieser Entwicklungsprozeß wurde zum Zeitpunkt 0 h durch eine dreistündige Belichtung induziert. Während der ersten 10 h konnten induzierte und Kontrollplasmodien morphologisch nicht voneinander unterschieden werden. Nach 10 h beginnt die Morphogenese, die nach 18 h mit der Melanisierung der Fruchtkörper äußerlich abgeschlossen ist. Lichtinduzierte, sporulierende Plasmodien wurden während bestimmten Stadien der Differenzierung mit [^{35}S]Methionin in vivo pulsmarkiert, und die Produkte auf zweidimensionalen Gelen analysiert. Bis etwa 8 h nach Beginn der Lichtinduktion konnten keine Unterschiede im Proteinsynthesemuster zwischen induzierten und Kontrollplasmodien nachgewiesen werden. Die zweite Markierungsperiode von 11-17 h umfaßte die Kulmination und Ausbildung des Fruchtkörpers und war durch die induzierte Synthese von mindestens 11 sporulationsspezifischen Proteinen charakterisiert. Da alle von ihnen in einem Puffer mit niedriger Ionenstärke und ohne SDS löslich waren, dürfte es sich bei diesen Proteinen nicht um Zellwandproteine handeln.

Durch selektive Copräzipitation mit isoliertem Schweinehirn-tubulin wurden 2 induzierte, differenzierungsspezifische Proteinspezies als α - bzw. β -Typ Tubuline identifiziert. Ihre apparenten Molgewichte betrugen 50 kD bzw. 56 kD, ihr isoelektrischer Punkt lag bei 5.3, womit sie den in Wachstumsplasmodien charakterisierten α - und β -Tubulinen sehr ähnlich waren. Durch zeitlich eng begrenzte in vivo Markierungsexperimente konnte der Zeitpunkt der maximalen

Stimulierung dieser Proteine auf etwa 13 h nach Induktionsbeginn festgelegt werden. Dieser Zeitpunkt korreliert mit einer von Sauer et al. (1969) für den gleichen Zeitraum postulierten Präsporenmitose.

Ein anderes Protein des Cytoskeletts, nämlich das Aktin, wurde in induzierten Plasmodien gegenüber den Kontrollplasmodien nur mehr in stark reduziertem Maß synthetisiert.

Die RNA aus induzierten Plasmodien, vom Beginn der Induktion bis zu 8 Tage alten Sporen wurde isoliert und im Reticulocytensystem *in vitro* translatiert. Die zweidimensionale Gelanalyse der Translationsprodukte zeigte auf, daß die Sporulation von umfangreichen Veränderungen der mRNA-Aktivität begleitet wird. Wie beim *in vivo* Markierungsexperiment traten die ersten sporulationsspezifischen Produkte rund 8 h nach Induktionsbeginn auf. Bis zur Melanineinlagerung in die äußere Sporenwand nach etwa 18 h wurden 43 induzierte oder in ihrer Synthese stark erhöhte mRNA-Spezies nachgewiesen. Die Analyse der einzelnen Stadien veranschaulichte den Ablauf eines hochsynchronen Programms der Aktivierung und Desaktivierung translatierbarer mRNA-Spezies. Acht von elf *in vivo* induzierten Proteinen konnten einem entsprechenden *in vitro* Produkt zugeordnet werden, jedoch überschritt die Zahl der induzierten mRNA-Spezies die der induzierten *in vivo* markierten Proteine um mehr als das Doppelte. Die stark reduzierte *in vivo* Synthese des Aktins während der Morphogenese ließ sich mit der An- und Abwesenheit der translatierbaren mRNA korrelieren, wobei die mRNA-Aktivität mit Beginn der Morphogenese drastisch abnahm, bei etwa 18 h nach Induktion ein Minimum erreichte, und im Verlauf der Sporenreifung innerhalb von acht Tagen wieder auf das Niveau der Kontrollplasmodien anstieg. Auch die 13 h nach Belichtung induzierte *in vivo* Tubulinsynthese konnte durch spezifische Copräzipitation der entsprechenden *in vitro* translatierten Produkte mit isoliertem Hirntubulin auf die Induktion translatierbarer Tubulin mRNA zurückgeführt werden.

Eine Fraktionierung isolierter poly(A)-mRNA nach poly(A)-Kettenlänge durch temperaturabhängige Elution von poly(U)-Sephadex zeigte, daß alle frisch induzierten mRNA-Spezies in sporulierenden Plasmodien einen deutlich höheren poly-Adenylierungsgrad aufwiesen, als Moleküle, deren Induktion wenige Stunden zurück lag. Dieser Befund stützte die Hypothese, daß während der Differenzierung eine Neu-Transkription stattfindet.

Um direkt die Konzentration spezifischer mRNA-Moleküle messen zu können, wurde poly(A)-RNA aus induzierten Plasmodien revers transkribiert, in *E. coli* cloniert und ein sporulationsspezifischer cDNA-Clon isoliert. Durch hybridselektionierte *in vitro* Translation konnte gezeigt werden, daß die cDNA von einer mRNA stammte, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für ein prominentes sporulationsspezifisches Protein codierte. Diese cDNA-Probe wurde in einem "Northern blot" Experiment gegen RNA aus induzierten und Kontrollplasmodien hybridisiert. Dadurch konnte nachgewiesen werden, daß in den induzierten Plasmodien eine mRNA (1.6 kb), die höchstwahrscheinlich die funktionelle translationsaktive mRNA-Spezies darstellt, im Vergleich zu den Kontrollplasmodien in etwa 20x höherer Konzentration vorhanden war.

Mit verschiedenen Restriktionsenzymen fragmentierte nukleäre DNA aus verschiedenen Stadien wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit der sporulationsspezifischen cDNA-Probe hybridisiert. Die in einigen Fällen beobachteten Unterschiede in der Größe der hybridisierenden Fragmente zwischen DNA aus hungernden und Wachstumsplasmodien deuteten auf eine Modifizierung der DNA durch Methylierung bzw. eine Umlagerung des Gens im Chromosom hin. Bei Verwendung von isoschizomeren Enzymen zur DNA-Fragmentierung wurden außerdem Unterschiede im Methylierungsgrad des entsprechenden Gens in wachsenden und hungernden Plasmodien einerseits und induzierten Plasmodien

andererseits gefunden.

Im Rahmen von Kontrollhybridisierungen mit dem pBR 322 Wildtypplasmid stellte sich zudem heraus, daß es in *Physarum* wahrscheinlich ein lineares extrachromosomales DNA-Stück mit einer Größe von 4.5 kb gibt, das einen sehr hohen Methylierungsgrad und starke Homologien zu dem derivatisierten *E. coli* Plasmid aufweist.

II. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1. Das Konzept der differentiellen Genexpression

Ein besonderes Merkmal höherer Organismen ist die Zelldifferenzierung, ein Vorgang, bei dem aus einer einzigen Zelle im Laufe der Entwicklung eine komplexe Vielfalt spezialisierter Zelltypen mit eng begrenztem Aufgabengebiet entsteht. Die verschiedenen Zelltypen eines Organismus verfügen über dieselbe genetische Information, die in definierten Abschnitten der DNA, den Genen, in Form eines Triplettcodes gespeichert ist. Die Zellen unterscheiden sich hingegen oft grundlegend in ihrer Form, Funktion und in ihren zellulären Bestandteilen wie Enzymen und Strukturproteinen und damit in der Expression ihrer Gene. Erst durch den Vorgang der differentiellen Genexpression wird also das identische Informationsangebot in definierter Weise dazu benutzt, die für jede Zelle charakteristische Struktur zu realisieren. Daraus ergibt sich eine der zentralen Fragen der Molekularbiologie, nämlich die nach der Regulation dieses Prozesses.

Besonders bei Prokaryonten, experimentell relativ leicht manipulierbaren Organismen, und hier vor allem beim Darmbakterium *Escherichia coli*, wurden verschiedene Regulationssysteme eingehend untersucht. Obwohl nicht differenzierungsbedingt, werden auch bei Bakterien bestimmte Gene aktiviert oder deaktiviert (etwa durch veränderte Umweltbedingungen). Die Untersuchungen führten zu einem weitgehenden Verständnis prokaryontischer Genexpression. Die postulierten Mechanismen, aufbauend auf dem 1961 von Jacob und Monod entworfenen Operonmodell, konnten in wichtigen Punkten verifiziert werden.

In der Folge stellte sich heraus, daß die an Bakterien

gewonnenen Erkenntnisse zum großen Teil nicht auf Eukaryonten übertragbar waren. Die beiden grundlegenden Teilprozesse der Genexpression, Transkription und Translation, sind zwar bei Prokaryonten und Eukaryonten dieselben, doch die Kontrolle der Genexpression und besonders die Genstruktur sind deutlich verschieden. Diese Schlußfolgerungen ergaben sich aus folgenden Befunden:

- (1) Die meisten eukaryontischen Gene sind wesentlich komplexer strukturiert als die Gene von Prokaryonten. Sie besitzen z.B. intervenierende Sequenzen (Introns), die zwar bei der Transkription mitkopiert werden, bei der Prozessierung zur reifen mRNA aber verloren gehen und offensichtlich keine Information zur Proteinsynthese tragen.
- (2) Eukaryontische Gene und mRNA-Moleküle sind fast ausnahmslos monocistronisch (d.h. eine mRNA codiert nur für ein Protein; Jacobson & Baltimore, 1968).
- (3) Es wurden bislang keine Operatorgene und Repressormoleküle, wie sie nach dem Operonmodell für Prokaryonten beschrieben wurden, in Eukaryonten gefunden.
- (4) Im Gegensatz zu Prokaryonten besitzen Eukaryonten mehrere RNA-Polymerasen mit speziellen Funktionen. Sie unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten wesentlich von dem prokaryontischen Enzym.

Ein allgemein akzeptiertes Schema der Genexpression in einer Eukaryontenzelle und mögliche Ansatzpunkte für eine Regulation sind in Abb. 1 dargestellt: Während der Transkription werden durch die RNA-Polymerase zuerst RNA-Vorläufermoleküle synthetisiert, die auch die Transkripte der Introns enthalten. Die meisten mRNA-Moleküle werden zudem am 5'-Ende mit einem 7-Methylguanosinrest (dem

sogenannten "cap") und am 3'-Ende mit einer etwa 150-200 Nukleotide langen poly(A)-Kette versehen. Nach dem Entfernen der intervenierenden Sequenzen ("splicing") entsteht ein reifes messenger-RNA Molekül, das jetzt aus dem Kern ins Cytoplasma geschleust wird. Dort assoziiert es mit den Ribosomen und dient als Vorlage für die Proteinsynthese. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, bestehen in einer Eukaryontenzelle mehrere Möglichkeiten, die Genexpression zu beeinflussen.

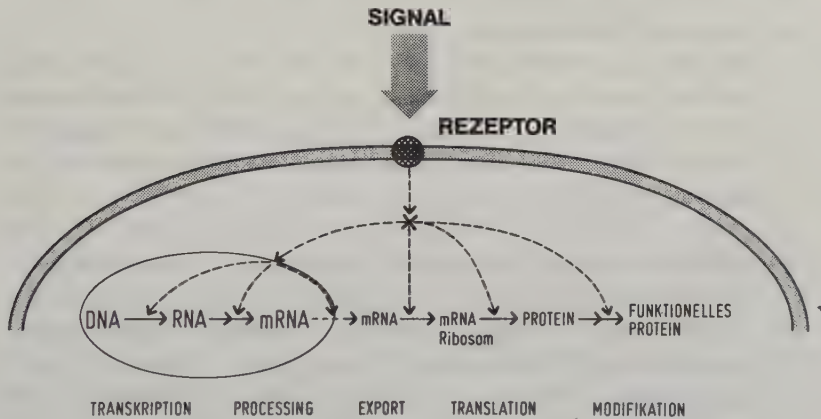


Abb. 1: Schematische Darstellung möglicher Regulationsebenen, auf denen ein externes Signal die Genexpression in Eukaryonten beeinflussen kann.

Einer Regulation der Transkription kommt dabei als erstem Schritt in einer komplexen Folge von Prozessen besondere Bedeutung zu. Die Wichtigkeit der Transkriptionskontrolle wird durch zahlreiche experimentelle Befunde bei verschiedenen Systemen unterstrichen. Ein Beispiel dafür ist die entwicklungsbedingte Veränderung des Hämoglobinmoleküls, vom Embryo über den Fötus zum Erwachsenen. Die für jedes Stadium charakteristischen Hämoglobine werden von

verschiedenen Genen kodiert (Weatherall & Clegg, 1979). Beim Schaf konnte die Umschaltung in der Synthese vom fötalen Hämoglobin zum adulten Hämoglobin exakt mit der An- bzw. Abwesenheit der entsprechenden mRNA Moleküle korreliert werden (Young et al., 1978)

Modifikationen, Umlagerungen und Strukturveränderungen der DNA sind von entscheidender Bedeutung für eine Transkriptionskontrolle. Zu den wichtigsten Kontrollmechanismen dieser Art zählen u.a. folgende:

(1) Die Genamplifizierung.

Ein Beispiel dafür ist die Eireifung bei Amphibien, während der die Gene für die 18S und 28S ribosomale RNA selektiv repliziert werden, bis etwa 75% der gesamten DNA aus amplifizierten rRNA-Genen besteht (Miller & Beatty, 1969).

(2) Transponierbare genetische Elemente (Transposons).

Diese sind DNA-Segmente mit einer Länge von etwa 1000 Basenpaaren, die ihren Platz innerhalb eines oder verschiedener Chromosomen variieren können. Dazu gehören etwa die verschiedenen Allele der mating type Gene in Hefe oder die Copia Gene in Drosophila.

(3) DNA-Methylierung.

In allen eukaryontischen Organismen konnte 5-Methylcytidin und in einzelligen Eukaryonten auch 6-Methyladenin nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise, daß aktiv transkribierte Gene nicht oder nur schwach methyliert sind. Allerdings gibt es keine strikte Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad und der "Aktivität" eines Gens (z.B. Kuo et al., 1979), sodaß über die Bedeutung der DNA-Methylierung in Eukaryonten noch keine eindeutigen Aussagen gemacht werden können.

Nach oder sogar noch während der Transkription ergeben

sich bei der Prozessierung der RNA weitere Möglichkeiten einer Regulation der Genexpression. Gut belegt ist z.B. ein Defekt beim "splicing" der β -Globin mRNA als Ursache einer Erbkrankheit, die durch das völlige Fehlen von normaler β -Globin mRNA gekennzeichnet ist (Kantor et al., 1980).

Zusätzlich zu den bisher aufgeführten Regulationsmechanismen auf Transkriptionsebene ermöglicht die komplexe Organisation und Struktur einer Eukaryontenzelle natürlich auch eine Regulation der Translation. Besonders auffallend ist die zum Teil extrem lange Halbwertszeit eukaryontischer mRNA-Moleküle, die bis zu mehreren Tagen betragen kann (im Gegensatz zu wenigen Minuten bei Prokaryonten). Dadurch ist es möglich, daß ein mRNA-Molekül auch wiederholt translatiert werden kann. Es gibt Hinweise, daß die poly-Adenylierung am 3'-Ende die Stabilität von mRNA-Molekülen in der Zelle entscheidend beeinflusst; deadenylierte mRNA-Moleküle, in *Xenopus* Eier injiziert, wurden wesentlich rascher abgebaut als die adenylierten Spezies (Chantrenne, 1977). Einzelne mRNA-Moleküle können im Cytoplasma auch als translationsinaktive Ribonukleoproteinkomplexe vorliegen oder gespeichert werden, aus denen bei Bedarf die aktive mRNA freigesetzt wird.

Als letzte Möglichkeit zur Regulation der Genexpression soll die posttranslationale Modifikation von Proteinen erwähnt werden. Beispiele sind etwa die Glykosylierung und Phosphorylierung, sowie die spezifische proteolytische Spaltung von Vorläufermolekülen (z.B. beim Insulin).

Eine Zelldifferenzierung erfolgt entweder im Rahmen eines Entwicklungsprogramms (z.B. während der Embryogenese) oder als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen. In jedem Fall gibt es ein Signal, das direkt oder indirekt die Expression spezifischer Gene reguliert.

So fand man in verschiedenen Systemen eine genaktivierende Wirkung von Steroidhormonen. Am Beispiel des Hühnerovidukts konnte gezeigt werden, daß verschiedene Proteine nur in

Gegenwart bestimmter Hormone synthetisiert werden. Diese binden zuerst an einen membrangebundenen Rezeptor und gelangen anschließend als Hormon-Rezeptor-Komplex in den Zellkern. Eine Untersuchung der Induktion der Ovalbuminsynthese durch das Hormon Stilböstrol zeigte, daß die selektive Aktivierung des Ovalbumingens auf einer durch das Hormon vermittelten Veränderung der Nüchthistonproteine im Ovidukt beruht (O'Malley et al., 1977) und daß eine strenge Korrelation zwischen der Initiation der Transkription des Ovalbumingens und der im Kern nachweisbaren Menge an Hormon-Rezeptor-Komplex besteht (Tsai et al., 1975).

2. Der Einfluß von Licht auf die Genexpression

Während in tierischen Systemen nur chemische Differenzierungssignale bekannt sind, spielt in pflanzlichen Organismen auch Licht eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Entwicklungsvorgängen (Photomorphogenese). Anhand der jeweils biologisch wirksamen Lichtqualität unterscheidet man im wesentlichen Rotlichteffekte sowie Blau- und UV-Lichtwirkungen. Beide können auch miteinander gekoppelt sein. In diesem Zusammenhang werden heute vor allem zwei Photorezeptorsysteme diskutiert: einerseits das Phytochromsystem, zum anderen Blau- und UV-Lichtrezeptoren.

Rotlicht-abhängige Entwicklungsprozesse (Wellenlänge > 530 nm) werden durch das Phytochrom vermittelt. Dieses besteht aus einem Chromoprotein mit einem Molekulargewicht von 124000 dalton und einem offenkettigen Tetrapyrrol als Chromophor. Die Entwicklung der keimenden Pflanze wird durch Licht in entscheidender Weise beeinflußt: während im Dunkeln gezogene Triebe ein starkes Streckenwachstum ohne Chlorophyllsynthese aufweisen, kann in belichteten Keimlingen ein reduziertes Längenwachstum, Blattbildung und Chlorophyllsynthese nachgewiesen werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen Phytochromwirkung und spezifischer

Enzyminduktion auf mRNA Ebene wurde z.B. im Fall des light-harvesting chlorophyll a/b Proteins in Gerste nachgewiesen (Apel, 1979; Gollmer et al., 1983).

Im Gegensatz zum gut charakterisierten Phytochrom konnte bislang keiner der Blau- und UV-Lichtrezeptoren isoliert werden. Obwohl viele experimentelle Daten für ein dem Riboflavin ähnliches Molekül sprechen, kann ein Carotenoid als hauptverantwortlicher Rezeptor nicht ausgeschlossen werden (DeFabo, 1980). Zu den wichtigsten, im Pflanzenreich weit verbreiteten Blau- und UV-Lichtwirkungen gehören ebenfalls die Photomorphogenese und phototrope Reaktionen. So wird in Tabaksuspensionskulturen die Differenzierung von Leukoplasten zu Chloroplasten durch blaues Licht induziert. Damit verbunden konnte eine spezifisch blaulichtabhängige Akkumulation von mRNA der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase nachgewiesen werden (Hundrieser & Richter, 1982). Als Beispiel für einen UV-Lichteffekt soll die stimulierte Synthese von mRNA der Chalkonsynthase (einem Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese) in der Petersilie-Zellkultur erwähnt werden (Kreuzaler et al., 1983). Während in höheren Pflanzen und Algen die Untersuchung des Blaulichteffekts durch die Anwesenheit anderer Photorezeptorsysteme wie etwa des Phytochroms erschwert wird, stellt sich die Situation in Pilzen und Schleimpilzen weit weniger komplex dar. In diesen Organismen, die keinen Photosyntheseapparat und nach heutigem Wissensstand auch kein Phytochrom besitzen, scheint der UV-/Blaulichtrezeptor das dominante photosensitive Pigment zu sein. Sie sind daher besonders für das Studium von Blaulichteffekten geeignet. Im Gegensatz zu höheren Pflanzen, in denen das Licht vor allem für die Photosynthese verwendet wird, übt das Licht in Pilzen und Schleimpilzen eine Vielzahl regulatorischer Funktionen bei verschiedenen Differenzierungsprozessen aus. Zum Beispiel induziert es in vielen Spezies die Fruchtkörperbildung, auch Sporulation genannt. Es wird angenommen, daß während der durch Blaulicht bewirkten Photomorphogenese die Genexpression über eine

Regulation der Transkription beeinflußt wird. Diese Hypothese stützt sich bei Pilzen und Schleimpilzen bislang jedoch nur auf indirekte Hinweise durch Inhibitorstudien oder Messungen der Gesamt-RNA-Synthese. Eine wichtige experimentelle Basis für die Postulierung einer blaulicht-regulierten Transkription, nämlich der Nachweis spezifischer photoregulierter mRNA-Spezies, steht noch aus.

3. Der Myxomycet *Physarum polycephalum* als Modellsystem zum Studium lichtregulierter Genexpression

3.1 Der Lebenszyklus von *Physarum polycephalum*

Physarum polycephalum ist ein niederer Eukaryont und gehört zur Klasse der azellulären Schleimpilze (Myxomyceten). Der Lebenszyklus eines normalen diploiden Stammes ist in Abb. 2 dargestellt. Beginnend mit der Auskeimung reifer Sporen entstehen zunächst haploide Amöben, eine der beiden vegetativen Lebensformen von *Physarum*. Amöben haben mehrere Möglichkeiten, sich durch Differenzierung einer veränderten Umwelt anzupassen, nämlich durch die Ausbildung von flagellierten Schwarmzellen oder die Enzystierung zu Mikrozysten.

Die zweite vegetative Lebensform dieses Organismus entsteht beim Übergang von der haploiden, einkernigen Amöbe in ein vielkerniges diploides Plasmodium. Dazu müssen zwei Amöben miteinander verschmelzen, die sich in den Allelen von mindestens 2 Genen unterscheiden (den sogenannten matingtype loci mt A und mt B). Bei Identität im einen oder anderen Allel findet keine Zell- bzw. Kernverschmelzung statt. Es handelt sich dabei um ein multipotentes System, da bereits über ein Dutzend verschiedener mating type Gene identifiziert wurden. Daneben gibt es auch apogame Stämme, bei denen

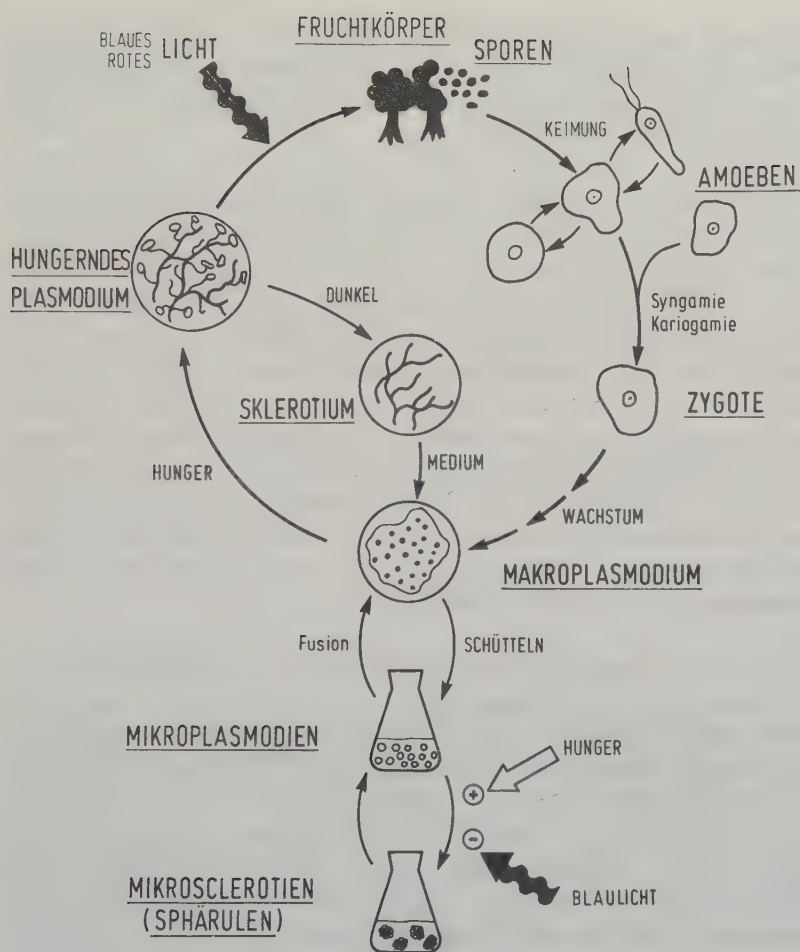


Abb. 2: Lebenscyclus des Myxomyceten *Physarum polycephalum*

sich eine haploide Amöbe ohne sexuelle Fusion zu einem ebenfalls haploiden Plasmodium entwickelt. Solche Stämme eignen sich besonders für genetische Studien, da eine Mutation sofort exprimiert wird.

Man kann die Plasmodienbildung auch als den Versuch eines Flagellaten betrachten, sich zu einem mehrzelligen Organismus zu entwickeln, bei dem die beiden Prozesse der Zell- und Kernteilung entkoppelt sind. Man hat daher die azellulären Schleimpilze an eine Gabelung der Evolution gesetzt und sie "niedere Eukaryonten" genannt. Dennoch gibt es auch bei höheren Eukaryonten, die sich normalerweise nach Fusion von Ei- und Spermienzelle durch weitere Zellteilungen entwickeln, Beispiele für eine vielkernige Plasmodienstruktur. In einigen Fällen von Parthenogenese, wo sich das Ei auch ohne sexuelle Rekombination entwickelt, wie etwa bei Insektenembryos, finden rasche Kernteilungen ohne begleitende Zellteilungen statt.

Ein *Physarum* Plasmodium besteht aus einer flachen gelben Zellmasse, die von zahlreichen Adern durchzogen ist, in denen das Zytoplasma durch rhythmisches "shuttle streaming" im gesamten Organismus gleichmäßig verteilt wird. Innerhalb eines Plasmodiums, das bei einem Durchmesser von 8 cm etwa 10^8 Kerne enthält, findet unter optimalen Wachstumsbedingungen alle 8 Stunden eine synchrone Mitose statt. Das Molekulargewicht eines haploiden Chromosomensatzes (bestehend aus etwa 40 Chromosomen) beträgt $1,7 \times 10^{11}$ Dalton. Das entspricht dem 63-fachen DNA-Gehalt einer *Escherichia coli* Zelle bzw. dem 1,5-fachen eines *Drosophila* Genoms. Erste Schätzungen der Sequenzvielfalt von poly(A)-RNA in Wachstumsplasmodien zeigten ein Potential für die Synthese von ungefähr 20000 verschiedenen Proteinen auf (Baeckmann, 1980).

Plasmodien können im Labor sowohl auf Oberflächen- als auch in Schüttelkultur gezüchtet werden. In Oberflächenkul-

tur gezogene, sogenannte Makroplasmodien, stellen eine Riesenzelle dar, die genügend Material enthält, um damit biochemische Versuche zu machen. Bei der Verwendung von Schüttelkulturen liegen die Plasmodien als kleine, unregelmäßige aber immer noch vielkernige Strukturen (Mikroplasmodien) vor. Sie werden durch die Schüttelbewegung an einer Fusion gehindert, wodurch allerdings der Vorteil der Synchronität verloren geht. Diese Methode der Kultivierung eignet sich besonders für die Anzucht großer Mengen. Durch Fusion der Mikroplasmodien auf einer Oberflächenkultur können schließlich Makroplasmodien hergestellt werden.

Wird ein Plasmodium ungünstigen Lebensbedingungen ausgesetzt, hat es zwei Möglichkeiten, zu differenzieren und damit zu überleben:

Die Sphärulation (Bildung von Makrozysten)

Die Sporulation (Bildung von Fruchtkörpern)

Beiden Differenzierungsprozessen ist gemeinsam, daß sie nur unter Hungerbedingungen oder anderen, für die Zelle nachteiligen Umständen ablaufen. Es bietet sich hier also die Möglichkeit, Differenzierungsprozesse getrennt von Wachstumsprozessen zu untersuchen. Sowohl bei der Sphärulation als auch bei der Sporulation spielt Licht eine entscheidende, wenn auch völlig unterschiedliche regulatorische Rolle.

3.2 Die Sphärulation

In der Natur erfolgt die Bildung von Makrozysten (auch Sphärulen genannt), wenn ein Plasmodium langsam austrocknet. Es wird Schleim produziert, die Plasmaströmung kommt zum Stillstand und eine dicke Zellwand kapselt Teile des

vielkernigen Protoplasten ab. Es entstehen Cluster von Makrozysten, ein sogenanntes Sklerotium. Im Labor kann dieser Differenzierungsprozeß unter definierten Bedingungen in Schüttelkultur durch den Transfer der Mikroplasmodien von Wachstums- auf Hungermedium induziert werden (Goodman et al., 1969). Dabei entstehen innerhalb von 25-30 Stunden reife Sphärulen, die morphologisch mit den Sklerotien von Makroplasmodien identisch sind. Der Prozeß ist vollständig reversibel, er kann jederzeit durch die Zugabe von Wachstumsmedium rückgängig gemacht werden. Ein entscheidender regulatorischer Mechanismus ist die Inhibition der Sphärolation durch blaues Licht. Die Inhibition erfolgt nur durch Dauerlicht von relativ hoher Intensität ($I = 20 \text{ W/m}^2$) und ist reversibel. Der wirksame Spektralbereich (Maxima bei 380 nm und 465 nm) legt die Beteiligung des typischen pflanzlichen Blaulichtrezeptors (Cryptochrom) nahe (Schreckenbach et al., 1981). Über längere Zeit belichtete Plasmodien bilden Pseudopodien aus und sind morphologisch eindeutig von wachsenden Mikroplasmodien zu unterscheiden. Die Wirkung des Lichts scheint dabei unabhängig von dem charakteristischen gelben Pigment der Wildtypzellen zu sein, da auch Plasmodien einer weißen Mutante sich in ihrem photobiologischen Verhalten nicht vom Wildtyp unterscheiden (Schreckenbach et al., 1981).

Viel Arbeit wurde in die Analyse von Enzymen investiert, die am Metabolismus von Makromolekülen, im besonderen für die Synthese der Zellwand (ein Galaktosaminoglykan), beteiligt sind, investiert. Bei der Untersuchung von über 50 Enzymen konnten jedoch kaum größere Schwankungen in der Aktivität festgestellt werden (Hüttermann et al., 1970). Als bisher einziges Ergebnis wurde das Fehlen einiger Isoenzyme von Aminopeptidasen während des Wachstums berichtet (Hoffmann & Hüttermann, 1975). Auch die erhöhte Schleimproduktion während der Differenzierung scheint keine Proteinsynthese zu erfordern. Es stellte sich daher die Frage, ob eine Transkription von Genen überhaupt an diesem

Differenzierungsprozeß beteiligt ist, oder ob nicht durch Veränderung der Substrate für bereits vorhandene Enzyme die Bildung von Makrozysten ermöglicht wird.

Die Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, die von sphärunderen und blaulicht-bestrahlten Plasmodien in vivo synthetisiert werden, hatte gezeigt, daß mindestens 5 Proteinspezies im Verlauf der Differenzierung induziert oder in ihrer Synthese stark erhöht waren. Alle 5 Proteine konnten in belichteten Plasmodien nicht nachgewiesen werden (Schreckenbach & Verfürth, 1982). Diese Ergebnisse waren ein erster Hinweis, daß die Sphärunderung von *Physarum* Plasmodien ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung licht-regulierter Genexpression ist.

3.3 Die Sporulation

Die Ausbildung von Fruchtkörpern ist für ein hungerndes Makroplasmodium der zur Sphärunderung alternative Weg, sich ungünstigen Umweltbedingungen anzupassen und zu überleben. Die Sporulation ist ein Phänomen, das ausschließlich bei Makroplasmodien auf Oberflächenkultur beobachtet wird. Sowohl die Sphärunderung als auch die Sporulation führen zu enzystierten Dauerformen. Während aber in den Sphärundern das diploide Plasmodienstadium konserviert wird, findet während der Fruchtkörperbildung beim Übergang vom diploiden Plasmodium zum haploiden Gameten eine Meiose statt. Die Sporulation ist also ein irreversibler Entwicklungsprozeß, der die Brücke zwischen den zwei vegetativen Lebensformen von *Physarum*, dem Plasmodium und der Amöbe, bildet. Die Fruchtkörperbildung wird nach Erreichen einer Kompetenzphase durch Licht induziert; im Dunkeln inkubiert, sphärunder das Plasmodium.

Es bietet sich hier also ein zweiter Differenzierungsprozeß an, bei dem die Wirkung des Lichts auf die Genexpression studiert werden kann, und zwar unter einem völlig anderen

Aspekt. Bei der Inhibibierung der Sphärulation handelt es sich um einen Prozeß der durch Dauerlicht von relativ hoher Intensität ($I = 250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) reversibel inhibiert werden kann.

Für die Induktion der Sporulation genügen dagegen Lichtintensitäten, die bis zum 250-fachen niedriger sind. Die wirksamsten Wellenlängen des Lichts liegen im nahen UV-Bereich bei 390 nm und im roten Spektralbereich bei etwa 700 nm, was die Beteiligung eines zweiten, rotlicht-absorbierenden Photorezeptors vermuten läßt (möglicherweise Phytochrom; Bialzyk, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Bedingungen, unter denen die Sporulation im Labor induziert und gehandhabt wird, seien im folgenden dargestellt.

Der gesamte Vorgang kann in drei Phasen gegliedert werden:

- (1) Eine etwa 4-tägige Hungerphase, in der die Kompetenz für die Lichtinduktion entsteht.
- (2) Die Induktionsphase; sie umfaßt eine 2-3stündige Belichtung der Plasmodien.
- (3) Der Ablauf der Morphogenese bis zur Bildung keimfähiger Sporen.

In der Hungerphase vor der Induktion finden nach wie vor Mitosen statt, allerdings nur mehr im Abstand von 24-36 Stunden. Es gibt Hinweise, daß die dritte Mitose nach Beginn der Hungerperiode für die Sporulation der Plasmodien essentiell sein könnte (Chapman & Coote, 1982). Trotz fortgesetzter Kernteilungen nimmt die Zahl der Kerne infolge einer kontinuierlichen Degradation ständig ab.

Der zweite Abschnitt umfaßt die 2-3stündige Belichtung der kompetenten Plasmodien, die gewöhnlich mit weißem Licht durchgeführt wird. Die Identifizierung des Photorezeptors steht noch aus und der Mechanismus, durch den die Lichtenergie in ein chemisches Signal umgewandelt wird, ist

ebenfalls unbekannt. Es gibt Hinweise, daß als Folge der Belichtung das während der anfänglichen Hungerphase in den Mitochondrien angesammelte Calcium ins Cytoplasma freigesetzt wird (Nicholls, 1972).

In Abb. 3 ist der auf die Induktion folgende Prozeß der Fruchtkörperbildung schematisch dargestellt. Bis etwa 8 h

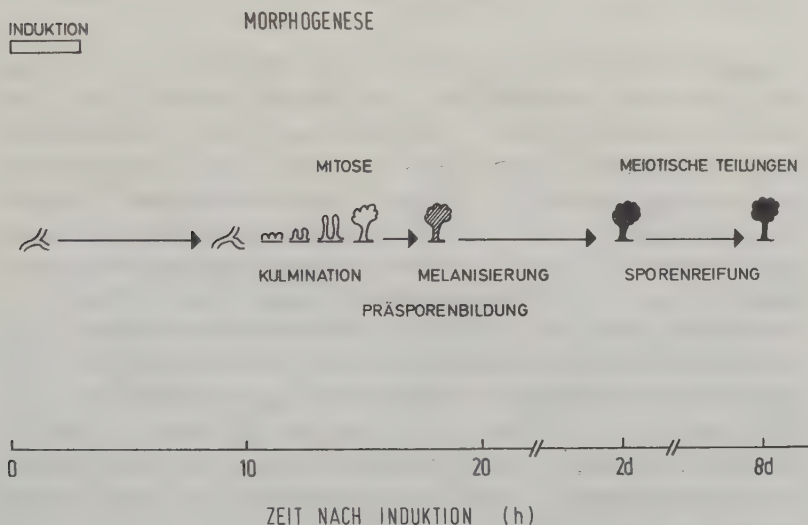


Abb. 3: Zeitliches Schema der lichtinduzierten Fruchtkörperbildung in *Physarum*

nach der Belichtung bleibt das induzierte Plasmodium in seiner äußeren Form unverändert. Elf bis zwölf Stunden nach Belichtungsbeginn schnüren sich die Venen des Plasmodiums ab und beginnen mit der Kulmination. Für diesen Zeitpunkt wurde eine Präsporenmitose postuliert (Sauer et al., 1969b). Nach 15 h ist der Fruchtkörper in seiner Form bereits determiniert, es bilden sich doppelwandige Präsporen und

nach 18 h färbt sich der Sporenträger durch Einlagerung von Melanin in die äußere Zellwand schwarz. Damit ist der für das Auge sichtbare Teil der Fruchtkörperbildung abgeschlossen (Kislev & Chet, 1973). Die anschließenden, meiotischen Teilungen finden im allgemeinen erst 24 h später statt, wobei dafür kein exakter Zeitplan existiert (Laane & Haugli, 1976). Nach weiteren 3-4 Tagen sind die Sporen schließlich reif für die Keimung.

Obwohl die Laborbedingungen für die Sporulation bereits seit langem gut ausgearbeitet sind (Daniel, 1966), gibt es bislang praktisch keine Informationen über spezifische Veränderungen der Genexpression während dieses irreversiblen Entwicklungsprozesses. Durch Inhibitorstudien wurde lediglich gezeigt, daß eine kontinuierliche Protein- und RNA-Synthese bis weit in die Morphogenese-phase hinein notwendig ist, um die Sporulation zu ermöglichen (Sauer et al., 1969a). Kompetitierungs-Hybridisierungen deuteten auf eine größere Sequenzvielfalt in sporulierenden als in wachsenden Zellen hin (Sauer et al., 1969c). Auf Proteinebene wurde durch in vivo Markierung gefunden, daß in induzierten Plasmodien nach Belichtung mehr Radioaktivität in höhermolekularen Proteinen eingebaut war als vorher (Jokusch et al., 1970).

4. Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit stand die Bearbeitung von zwei Themen im Vordergrund:

- (1) Anhand der **Sphärulation** von *Physarum* Mikroplasmodien sollte die Regulation der Genexpression durch blaues Licht studiert werden. Für die Untersuchungen stellte sich als zentrale Frage, ob und in welcher Weise Blaulicht die Aktivität spezifischer mRNA-Spezies

reguliert.

(2) Mit den im Rahmen der obigen Fragestellung zu etablierenden Methoden sollte dann die Sporulation bei *Physarum* als Modellsystem für licht-induzierte Differenzierung in einem nicht photosynthetischen Organismus biochemisch charakterisiert werden. Hierfür waren folgende Grundlagen zu erarbeiten:

- Identifizierung von Proteinen, die im Verlauf der Differenzierung reguliert werden.
- Experimente, die zeigen, auf welcher Ebene der Genexpression die Regulation erfolgt.
- Isolierung sporulationsspezifischer cDNA Clone. Mit Hilfe dieser Hybridisierungsproben sollten differenzierungsabhängige Konzentrationsänderungen einzelner mRNA-Spezies erfaßt und mögliche Mechanismen einer differentiellen Genexpression untersucht werden.

III. ERGEBNISSE

1. Der Einfluß von Blaulicht auf die Genexpression in hungernden Mikroplasmodien

1.1 Proteinsynthese in vivo

1.1.1 In vivo Pulsmarkierung mit [^{35}S]-Methionin und Analyse der Produkte durch zweidimensionale Gelelektrophorese.

Mikroplasmodien wurden über 3 Tage in Schüttelkultur hochgezogen, und in einer Konzentration von 26 mm^3 Zellen/ml in Sphärulationsmedium resuspendiert. Für die Markierung mit [^{35}S]-Methionin wurden zwei Zeitbereiche ausgewählt:

- (1) die ersten 8 Stunden nach dem Transfer der Mikroplasmodien auf Sphärulationsmedium: Dieser Zeitraum ist durch eine maximale Photosensitivität der Plasmodien gekennzeichnet (Schreckenbach et al., 1981).
- (2) der Bereich von 16-32 h nach dem Transfer: dieser Zeitraum umfaßt bei im Dunkeln inkubierten Plasmodien die Entstehung von Sphärulen, während die belichteten Plasmodien morphologisch distinkte "Lichtzellen" bilden, die sich durch ausgeprägte Pseudopodienbildung auszeichnen.

Die Belichtung erfolgte hier wie in allen anderen Versuchen durch kontinuierliche Bestrahlung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 465\text{-nm}$, $I = 250 \mu\text{W/cm}^2$). Nach Beendigung der Markierung wurde das Protein ausgefällt und extrahiert. Die markierten

Proteine wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. Abbildung 4 zeigt die entsprechenden Fluorographien. Bei einer Analyse der von sphärolisierenden Plasmodien synthetisierten Proteine (Abb. 4A und 4B) ist klar erkennbar, daß während der eigentlichen Differenzierungsphase (16-32 h) mindestens 20 Proteinspezies induziert werden oder in ihrer Synthese stark erhöht sind. Sie sind mit Zahlen markiert und werden hier Sphärolisierungsproteine genannt, da ihre Synthese mit der Morphogenese zeitlich korreliert. Das weiß umrahmte Protein ist auf Grund seines isoelektrischen Punktes von 5.6, eines Molekulargewichts von 43 kD und der Tatsache, daß es auch in Coomassie Blue gefärbten Gelen die Hauptkomponente darstellt, höchstwahrscheinlich Aktin. Es dient hier als Referenz für die Zuordnung von Proteinen auf verschiedenen Gelen. Die Auftrennung der in belichteten Zellen im selben Zeitraum synthetisierten Proteine wird in den Abbildungen 3C und 3D gezeigt. Die Unterschiede zwischen der frühen und späten Markierungsphase sind geringfügig; lediglich 3 Proteine wurden während der zweiten Hungerphase durch Licht induziert (Abb. 4D, Proteine mit Kreisen markiert). Vergleicht man nun die Proteinsynthesemuster von sphärolisierenden und belichteten Plasmodien, so läßt sich folgendes feststellen:

- 1) Licht hat keinen Einfluß auf die während der ersten 8 Stunden synthetisierten Proteine (vergl. Abb. 4A und 4C).
- 2) Licht hemmt die Induktion der Sphärolisierungsproteine (vergl. Abb. 4B und 4D) und erhält im wesentlichen das für das Plasmodienstadium charakteristische Proteinsynthesemuster. Durch Kontrollversuche konnte schließlich gezeigt werden, daß die drei ausschließlich in belichteten Zellen markierten Proteinspezies in Wachstumsplasmodien nicht photoinduziert werden. Die geschilderte Lichtwirkung ist ein spezifischer Blaulichteffekt; das Proteinsynthesemuster von mit Rotlicht bestrahlten Zellen ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $I = 5 \text{ mW/cm}^2$) unterscheidet sich nicht von dem sphärolisierender Plasmodien. Dies stimmt gut mit der Tatsache überein, daß Licht mit einer

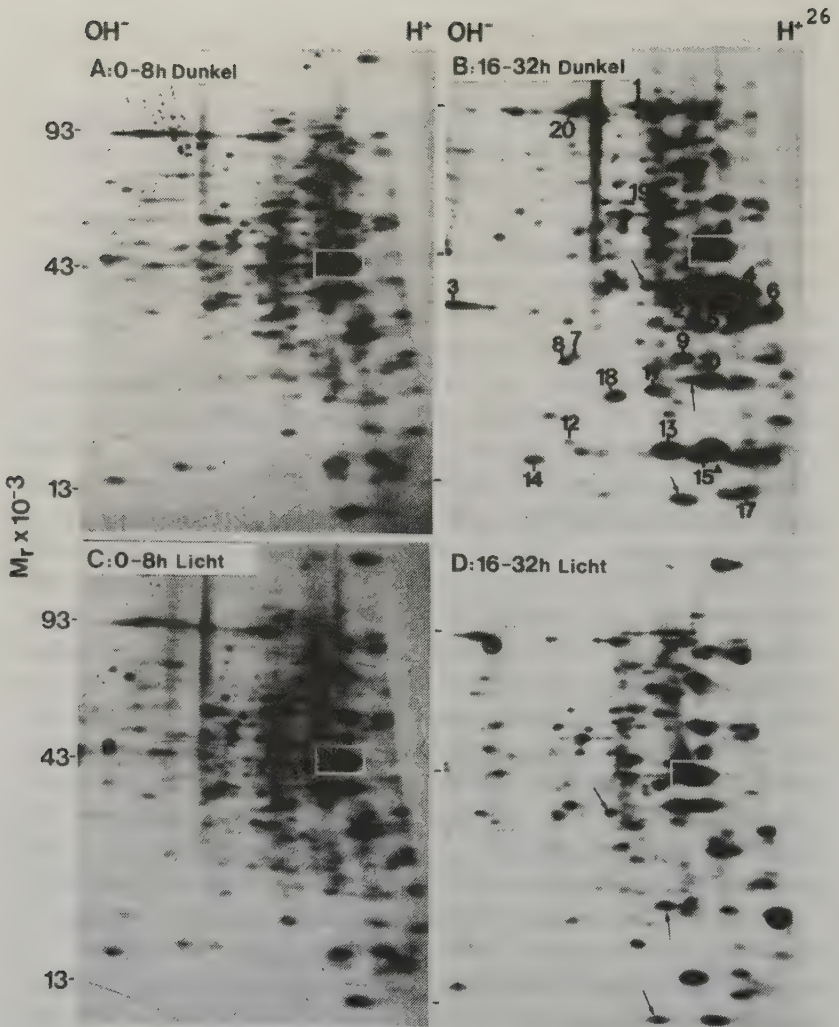


Abb. 4: Photoregulation der *in vivo* Proteinsynthese. Mikroplasmoiden wurden in Sphärolationsmedium suspendiert und auf 4 Gefäße verteilt. Zwei Proben (A,B) wurden im Dunkeln, die anderen beiden (B,C) im Licht inkubiert. Die Proteine wurden wie angegeben jeweils von 0-8 h und 16-32 h mit [³⁵S]Methionin *in vivo* markiert (10 μ Ci/ml), extrahiert, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (IEF/SDS-Gradientengel 5-20 %) aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. Durch Licht inhibierte, sphärolenspezifische Proteine sind mit Nummern, Zellwandproteine mit einem zusätzlichen Dreieck, lichtinduzierte Proteine mit einem Kreis und Hungerproteine mit einem Pfeil markiert. Das vermutliche Aktin ist mit einem weißen Rechteck gekennzeichnet.

Wellenlänge von >570 nm die Sphärulation nicht hemmt (Schreckenbach et al., 1981)

3) Neben den Sphärulen- und lichtinduzierten Proteinen gab es noch eine dritte Klasse induzierter Proteine. Ihre Synthese konnte sowohl in sphärulierenden als auch in belichteten Zellen während der späten Markierungsperiode nachgewiesen werden. Diese "Hungerproteine" sind in Abb. 4B und 4D mit Pfeilen markiert.

1.1.2 Isolierung und Charakterisierung von Zellwandproteinen aus Sphärulen

Die Bildung einer Zellwand ist die morphologisch auffälligste Veränderung während der Sphärulation. Es wurden daher die Zellwandproteine aus Sphärulen extrahiert (McCormick et al., 1970; Putzer et al., 1983) und charakterisiert, um sie eventuell induzierten Sphärulenproteinen zuordnen zu können. Abbildung 5 zeigt eine zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung gereinigter Zellwandproteine (Coomassie-Färbung). Die mit den Zahlen 2, 5 und 15 gekennzeichneten Wandproteine sind mit den entsprechend nummerierten Produkten der in vivo Markierung (Abb. 4B) bezüglich isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht identisch (verifiziert durch elektrophoretische Auftrennung gemischter Proben). Durch Abtasten des pH-Gradienten der ersten Dimension mit einer Mikroelektrode wurden Werte von 5.8 (Proteine 2 und 15) und 5.7 (Protein 5) für die isoelektrischen Punkte ermittelt. Die aus der zweiten Dimension erhaltenen Rf-Werte ergaben Molekulargewichte von 35000, 34000 und 14000 Dalton (Proteine 2, 15 und 5).

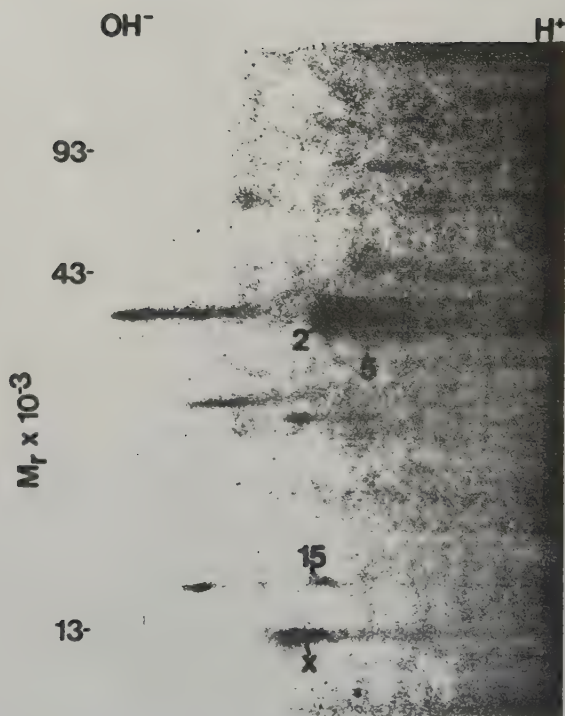


Abb. 5: Isolierte Zellwandproteine aus Sphärulen. Die Proteine wurden aus isolierten Zellwänden extrahiert und in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt (IEF/SDS-Gradientengel 5-20 %). Gezeigt ist eine Coomassie Blau Anfärbung. Die Proteine 2, 5, 15 und x waren nach elektrophoretischen Kriterien mit den entsprechenden Proteinen in Abb. 4B und 6D identisch.

1.2 RNA-Synthese in vivo

Die oben dargestellten *in vivo* Proteinmarkierungsexperimente hatten gezeigt, daß während der Sphärulation mindestens 20 neue Proteinspezies induziert werden, deren Synthese durch die Wirkung des Lichts gehemmt wird. Mit den beschriebenen Experimenten konnten zwar die differenzierungsspezifischen Proteine charakterisiert werden, aber sie lassen keine Rückschlüsse zu, auf welcher Ebene der Genexpression das Licht seine regulatorische Wirkung ausübt. Denkbar wäre, daß die Lichtwirkung sich in einem Unterschied der Gesamt-RNA-Synthese manifestiert. Dies müßte sich vor allem während der ersten acht Stunden zeigen, da anschließend das Licht die Sphärulation nicht mehr vollständig hemmen kann.

1.2.1 Kontinuierliche Markierung mit [^3H]Uridin

Unmittelbar nach dem Transfer der Wachstumsplasmodien auf Hungermedium wurde [^3H]Uridin zugegeben und der Einbau in RNA über einen Zeitraum von 14 h gemessen. Der eine Teil der Zellen wurde während dieser Zeit in völliger Dunkelheit und der andere unter kontinuierlicher Bestrahlung mit Blaulicht inkubiert. Die [^3H]Uridin Einbaukurven sind aus Abb. 6 ersichtlich. Im Rahmen der Meßgenauigkeit waren keine Unterschiede in der Gesamt-RNA-Synthese festzustellen. Während der ersten sechs Stunden wurde über 95 % der inkorporierten Radioaktivität in ribonuklease-sensitivem Material wiedergefunden. In diesem Zeitraum konnten keine Unterschiede im [^3H]Uridineinbau, der ja durch das Gleichgewicht zwischen Synthese- und Abbauraten der RNA bestimmt wird, festgestellt werden. Deshalb wurde auf zusätzliche Kontrollexperimente (z.B. Ausmaß der Metabolisierung des radioaktiven Vorläufers) wie sie für die späteren Meßwerte sicher erforderlich wären, verzichtet.

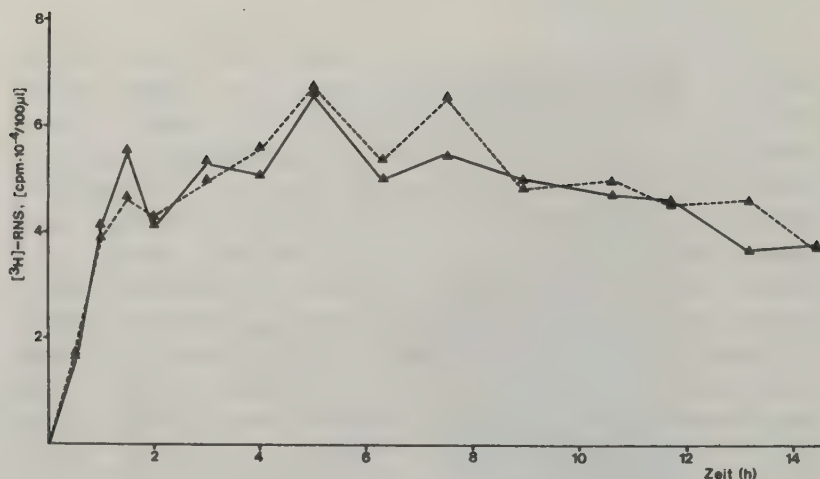


Abb. 6: RNA-Synthese in belichteten und Kontrollplasmodien. Mikroplasmodien wurden in Sphärulationsmedium suspendiert, mit [³H]Uridin (2.5 μCi/ml) versetzt und auf zwei Gefäße verteilt, von denen das eine im Dunkeln und das andere im Licht inkubiert wurde. Der kontinuierliche Einbau des radioaktiven Vorläufers in die RNA wurde über einen Zeitraum von 14 h gemessen. Aus den Proben wurden die Nukleinsäuren extrahiert und die in RNase-sensitives Material inkorporierte Radioaktivität bestimmt. Belichtete Plasmodien: ---. Dunkelkontrolle (sphärulierende Plasmodien): —.

1.2.2 Pulsmarkierung mit [³H]Uridin

Um geringfügige lichtinduzierte Veränderungen der Syntheserate erfassen zu können, wurden Pulsmarkierungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation durchgeführt. Wachstumsplasmodien wurden wiederum in Hungermedium suspendiert, auf zwei Gefäße verteilt und auf einem Schüttler inkubiert. Das eine Gefäß (Kontrolle) wurde im

Dunkeln gehalten, während die Probe nach einer fünfstündigen Vorinkubation im Dunkel mit Blaulicht kontinuierlich bestrahlt wurde. In definierten Zeitintervallen wurden Aliquots entnommen, mit [^3H]Uridin versetzt und 40 min pulsmarkiert. Nach anschließender Extraktion der Zellen wurde die in die RNA eingebaute Radioaktivität gemessen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die Inkorporation des radioaktiven Vorläufers in die RNA über einen Zeitraum von mindestens 50 Minuten linear verläuft. Die RNA-Syntheseaktivität wurde auf den DNA-Gehalt bezogen. Auch die von der Zelle für während der Pulsmarkierung aufgenommene Menge an [^3H]Uridin wurde in Kontrolle und Probe gemessen. Die Werte für zwei Zeitpunkte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt:

	[^3H]Uridin im Cytoplasma (cpm/0.25 ml Suspension)	DNA-Gehalt ($\mu\text{g}/0.25\text{ ml}$ Suspension)	[^3H]Uridin Einbau in RNA (cpm/0.25 ml Suspension)
Kontrolle 5 h	102 162	3.87	7343
Probe 5 h (Licht an)	122 671	4.25	6314
Kontrolle 8 h	93 668	3.90	9255
Probe 8 h	103 832	4.28	13598

Aus den Daten ist ersichtlich, daß während der ersten 8 h keine signifikanten Unterschiede in der aufgenommenen Menge an [^3H]Uridin bestehen. Das Ergebnis des Experiments ist in Abb. 7 dargestellt und zeigt eine etwa 60%ige transiente Stimulierung der Gesamt-RNA-Synthese drei Stunden nach Belichtungsbeginn. Diese dreistündige Verzögerung zwischen dem Anschalten des Lichts und der maximalen Stimulierung der RNA-Syntheserate blieb konstant, wenn der Belichtungsbeginn innerhalb der ersten acht Stunden lag. Die beobachtete Stimulierung könnte eine verstärkte Synthese ribosomaler RNA reflektieren, die in belichteten Plasmodien dazu dient,

die bisher synthetisierten Proteine auch unter Hungerbedingungen weiter zu produzieren. Während in den belichteten Plasmodien die RNA-Syntheserate nach 20 h deutlich abnimmt, ist in reifen Sphärulen wahrscheinlich auf Grund der undurchlässigen Zellwand keine Synthese mehr nachweisbar.

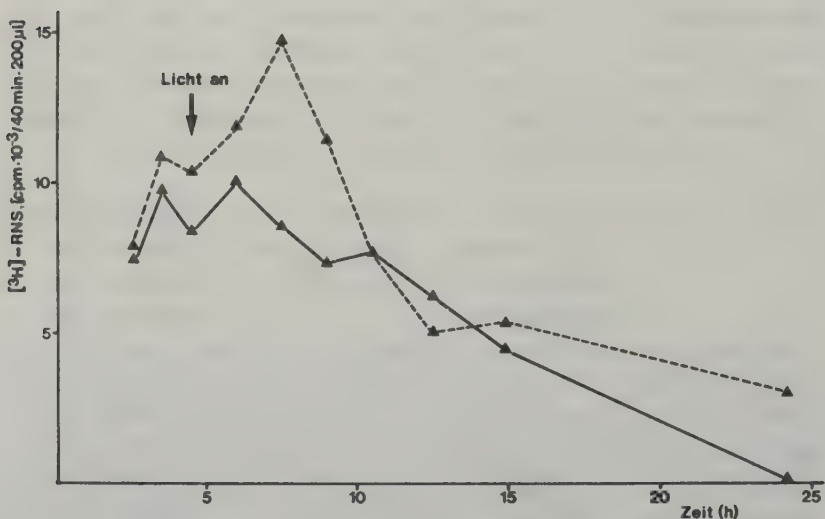


Abb. 7: RNA-Syntheseraten in belichteten und Kontrollplasmodien. Mikroplasmodien wurden in Sphärulationsmedium suspendiert, für 5 h im Dunkeln inkubiert und anschließend geteilt. Der eine Teil verblieb im Dunkeln und der andere wurde im Licht weiter inkubiert. Es wurden jeweils 3 ml Aliquots entnommen und 40 min mit $[^3\text{H}]$ Uridin ($5\mu\text{Ci/ml}$) pulsmarkiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und die in RNase-sensitives Material eingebaute Radioaktivität gemessen.

1.3 Untersuchung des Blaulichteffekts auf mRNA-Ebene

Es stellte sich im folgenden die Frage, wie und in welchem Ausmaß Blaulicht die Synthese einzelner mRNA-Spezies beeinflusst. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Sphärulenproteine gelegt.

Die mRNA aus *Physarum* kann wie andere eukaryontische mRNAs im heterologen Retikulozytensystem in vitro translatiert werden. Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese können die Translationsprodukte analysiert und mit den in vivo markierten Proteinen verglichen werden.

Da bei der Extraktion von *Physarum* Plasmodien große Mengen an Ribonukleasen freigesetzt werden, ist ein rasch denaturierendes Reagens beim Aufschluß der Zellen unbedingt erforderlich, um intakte RNA-Moleküle isolieren zu können. Zwei Methoden erwiesen sich dabei als zuverlässig:

A) Extraktion der Zellen bei 0°C mit 2 % SDS, vorgereinigtem Bentonit als Ribonukleaseinhibitor und anschließender Phenolextraktion (Melera, 1978; Werenskiold, 1982).

B) Aufschluß der Mikroplasmodien in 4 M Guanidiniumthiocyanat bei Raumtemperatur (Chirgwin et al., 1979; Werenskiold, 1982).

Die Intaktheit der isolierten RNA wurde in einem sauren Harnstoffgel anhand der ribosomalen Banden und anschließend durch in vitro Translation überprüft. Trotz zahlreicher Versuche, die nach der Phenolmethode gewonnene RNA weiter zu reinigen (z.B. Fällung mit 8 M LiCl oder Waschen mit 1 M Natriumacetat), konnte keine Translation in vitro erhalten werden. Erst die Anreicherung von poly(A)-RNA durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose brachte das gewünschte Ergebnis. Nur nach der Guanidinium-SCN Methode isolierte Gesamt-RNA konnte direkt im Retikulozytensystem translatiert werden (Werenskiold, 1982).

Zu verschiedenen Inkubationszeiten (0 h/10 h/15 h/25 h

nach dem Transfer auf Hungermedium) wurde aus sphärunderen und belichteten Plasmodien Gesamt-RNA extrahiert. Diese Präparationen wurden dann unter Verwendung von nuklease-behandeltem Retikulozytenlysat in vitro translatiert. Die mit [35 S]-Methionin markierten Produkte wurden elektrophoretisch zweidimensional aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. Die Auswertung der Gele erbrachte folgende Aussagen:

- 1) Der Zeitraum vom Beginn der Hungerphase bis zur Bildung reifer Sphärulen ist vom Auftreten zahlreicher neuer mRNA-Spezies geprägt (Abb. 8A-D). Die meisten davon, nämlich 26 (mit Buchstaben bzw. Nummern gekennzeichnet), wurden nur in differenzierenden, nicht aber in belichteten Plasmodien gefunden (vergl. Abb. 8D und Abb. 9D). Sechs dieser sphärunderenspezifischen mRNAs codieren für Proteine, die bereits bei den in vivo Experimenten charakterisiert worden waren (vergl. Abb. 8D und 4B, Proteine mit Zahlen markiert). Zwei der Translationsprodukte (Abb. 8D, Proteine x und 15) sind bezüglich isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht mit isolierten Zellwandproteinen identisch (vergl. Abb. 8D und 5). Die Anwesenheit sphärunderenspezifischer mRNA-Moleküle konnte erstmals nach einer Hungerperiode von 8-10 h nachgewiesen werden (Abb. 8B, Proteine c,d,e und y).
- 2) Einige mRNA-Spezies wurden unspezifisch durch Hunger induziert, da ihre Translationsprodukte auch in belichteten Plasmodien gefunden wurden (Abb. 8 und 9, Proteine mit Pfeilen markiert).
- 3) Zahlreiche für das Plasmodienstadium charakteristische mRNA-Spezies waren durch in vitro Translation kaum oder gar nicht mehr nachweisbar. Das prominenteste Beispiel ist das (vermutliche) Aktin, dessen mRNA zu Beginn der Hungerphase noch einen dominanten Anteil an der Gesamttranslationsaktivität hatte. Mit fortschreitender Differenzierung nahm die Menge an translatierbarer Aktin mRNA jedoch stark ab (vergl. Abb. 8A und 8D, weiß umrahmtes Protein). In belichteten Plasmodien wurde diese Abnahme nicht beobachtet (Abb. 9D).

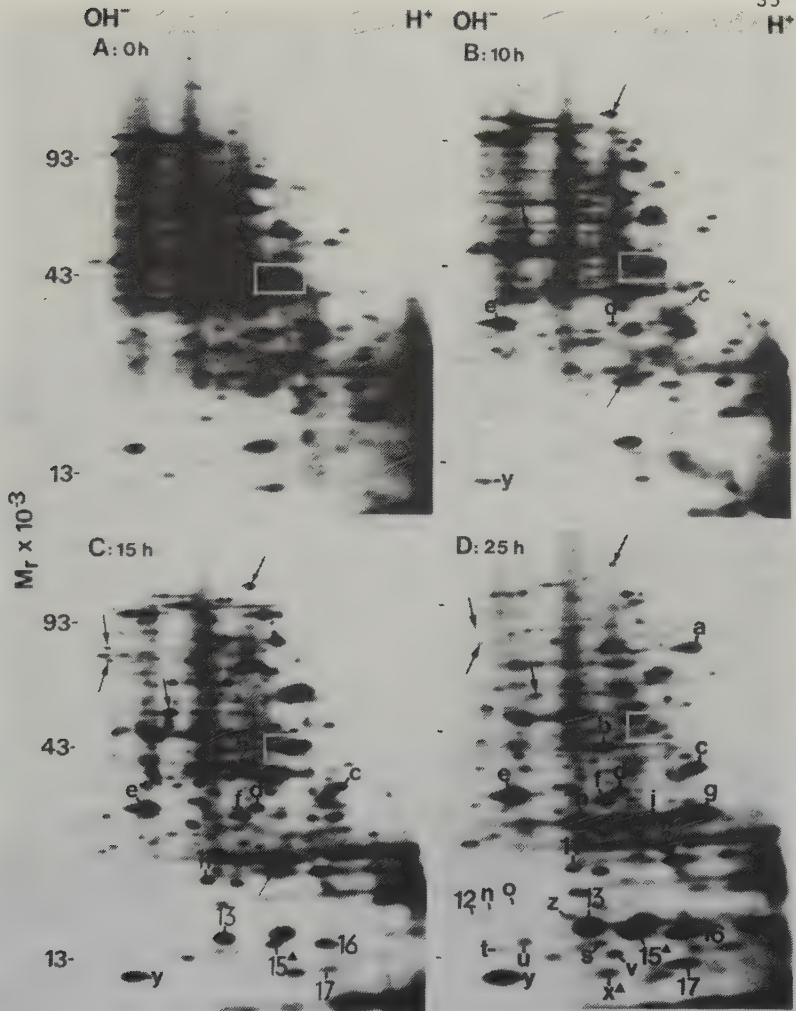


Abb. 8: Induktion translatierbarer mRNA-Spezies während der Sphärlulation. Gesamt-RNA aus Mikroplasmodien wurde zu den angegebenen Zeiten nach dem Transfer auf Sphärlulationsmedium isoliert, in Gegenwart von $[^{35}\text{S}]$ Methionin *in vitro* translatiert und die Produkte durch zweidimensionale Gelelektrophorese (IEF/SDS-Gradientengel 5-20 %) aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. Die Translationsprodukte sphärlulenspezifischer mRNAs sind mit Buchstaben, im Fall der Identität mit *in vivo* Produkten mit Nummern gekennzeichnet. Dreiecke bezeichnen Zellwandproteine und Pfeile Hungerproteine, die von mRNAs aus sphärlulierenden und belichteten Plasmodien codiert werden. Das vermutliche *in vitro* synthetisierte Aktin ist weiß umrahmt.

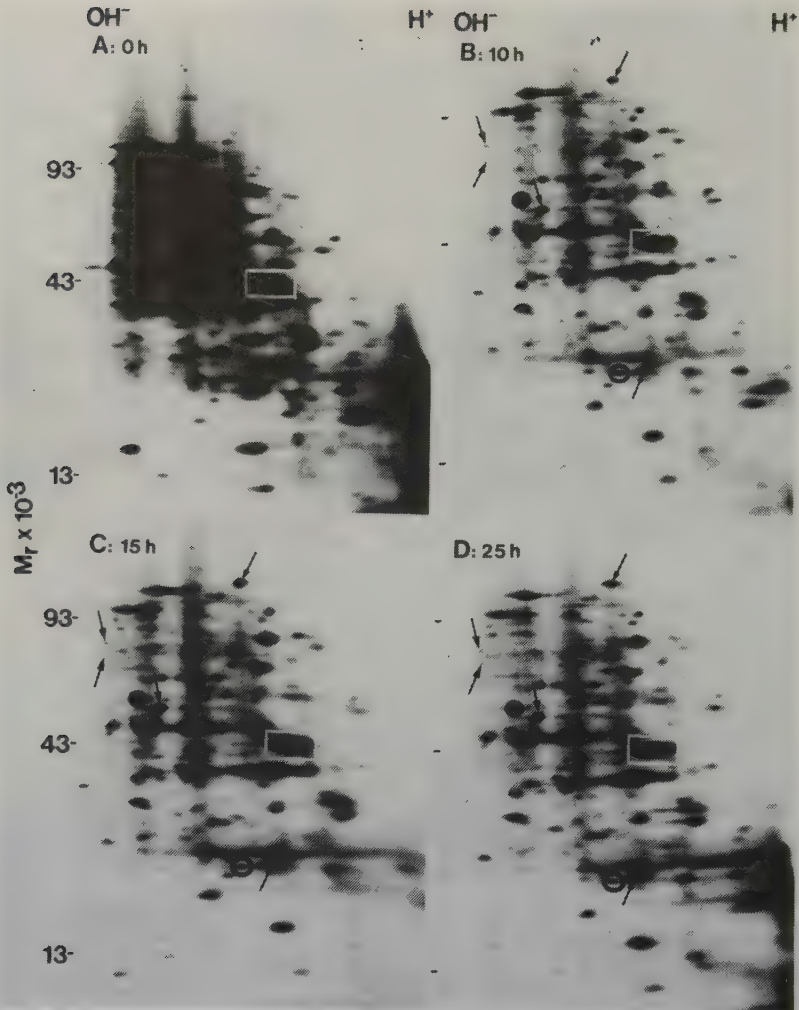


Abb. 9: Licht-regulierte mRNAs. Mikroplasmodien wurden in Sphärulationsmedium inkubiert und mit Blaulicht bestrahlt. RNA-Extraktion, in vitro Translation und Proteinauftrennung wurden wie im Experiment von Abb. 6 durchgeführt. Die Proben wurden zu den angegebenen Inkubationszeiten aufgearbeitet. Licht-induzierte Produkte sind mit Kreisen markiert. Die Pfeile kennzeichnen Proteine, die von unspezifisch durch Hunger induzierten mRNAs codiert werden. Das vermutliche Aktin ist weiß umrahmt.

4) In belichteten Plasmodien treten im selben Zeitraum nur zwei lichtinduzierte mRNA-Spezies auf (Abb. 9, Proteine mit Kreisen markiert). Im wesentlichen bleibt das für Plasmodien charakteristische *in vitro* Translationsmuster erhalten.

Obwohl die Zahl der *in vitro* und *in vivo* induzierten Produkte in etwa übereinstimmt, konnte der größte Teil der *in vitro* synthetisierten Translationsprodukte nicht einem entsprechenden *in vivo* Produkt zugeordnet werden (Abb. 8D, Proteine mit Buchstaben markiert, Abb. 9, Proteine mit Kreisen gekennzeichnet). Dies könnte zum einen darauf zurück zu führen sein, daß die untersuchten Proteine in der Zelle einer posttranslationalen Modifikation unterliegen, welche im heterologen System nicht stattfindet. Zum anderen wäre denkbar, daß solche Proteine *in vivo* auf Grund einer spezifischen Translationskontrolle in weit geringerem Ausmaß synthetisiert werden und folglich im komplexen Proteinhintergrund schwer nachweisbar wären.

Bei den belichteten Plasmodien konnte ebenfalls eine zahlenmäßige Übereinstimmung zwischen induzierten *in vivo* und *in vitro* Produkten gefunden werden. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurden nur wenige Spezies durch Licht induziert. Im wesentlichen blieb der für ein hungerndes Plasmodium charakteristische Zustand erhalten (Abb. 8 und 9). Blaues Licht inhibiert also die Differenzierung, indem es die Induktion sphäruationspezifischer mRNA-Spezies hemmt. Eine mögliche Alternative wäre die durch Licht induzierte Desaktivierung sphäruationspezifischer mRNA-Spezies etwa in Form von translationsinaktiven Ribonukleoproteinkomplexen. Dies erscheint unwahrscheinlich, da bei einer Behandlung der Zellen mit 4 M Guanidinium-SCN vermutlich jegliche Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung aufgehoben wird. Es liegt daher nahe, daß das Licht in die Transkription oder das Processing der RNA regulatorisch eingreift.

2. Die lichtinduzierte Sporulation und damit verbundene Veränderungen der Genexpression

2.1 Analyse der im Verlauf der Sporulation in vivo synthetisierten Proteine

Makroplasmodien wurden nach zwei Tagen Wachstum auf Hungermedium transferiert und am vierten Hungertag durch eine zweieinhalbstündige Belichtung induziert. In vivo Pulsmarkierungen mit [^{35}S]-Methionin wurden während einer frühen Phase (0-4 h und 4-8 h nach Beginn der Induktion) und während der Morphogenese (11-17 h) durchgeführt. Die markierten Proteine wurden ausgefällt und mit einem SDS-Extraktionspuffer bzw. Sucrosepuffer niedriger Ionenstärke extrahiert und auf zweidimensionalen Gelen analysiert. In der frühen Phase nach Beginn der Induktion konnten keine Unterschiede im Proteinsynthesemuster zwischen induzierten und Kontrollplasmodien festgestellt werden (nur die induzierten Plasmodien, 0-4 h, gezeigt, Abb. 10A). Hingegen war die zweite Markierungsphase, welche die gesamte Morphogenese umfaßte, durch die Synthese von mindestens 11 sporulationsspezifischen Proteinen und die Abschaltung einiger plasmodienspezifischer Proteine gekennzeichnet (Abb. 10B, induzierte Proteine sind mit Zahlen bzw. Buchstaben markiert). Alle induzierten Proteine waren auch in einem Sucrosepuffer mit niedriger Ionenstärke und ohne SDS löslich. Es liegt daher nahe, daß es sich nicht um Zellwandproteine handelt. Die Proteine 10 und 15 traten manchmal auch in nicht induzierten Plasmodien verstärkt auf. Da auch in hungernden Plasmodien weiterhin Kernteilungen stattfinden (alle 24-36 h), ließ dies eine zellzyklusabhängige Synthese vermuten. Die Aufarbeitung der Plasmodien

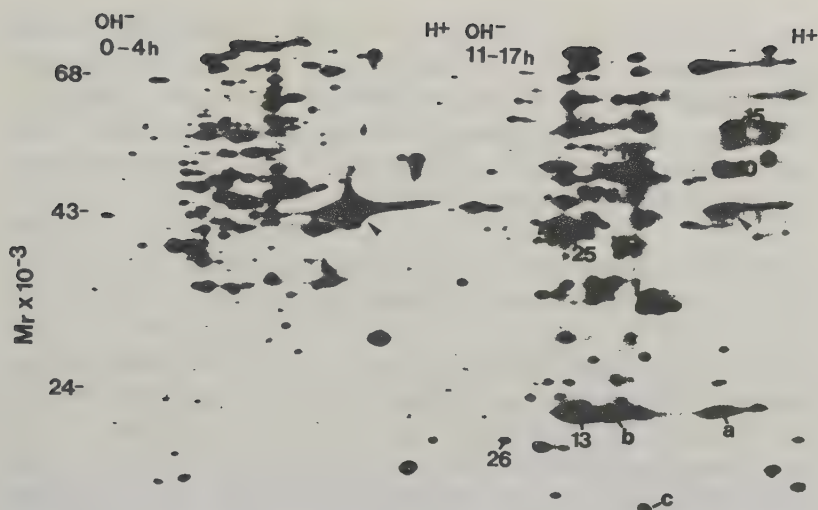


Abb. 10: In vivo Proteinsynthese während der Sporulation. Kompetente Plasmodien wurden durch eine dreistündige Belichtung induziert. Teile des Plasmodiums wurden entfernt und mit [35 S]Methionin pulsmarkiert. Die Markierungen wurden von 0-4 h und 11-17 h durchgeführt. Die jeweiligen Kontrollmarkierungen mit nicht induzierten Plasmodien (nicht gezeigt) ergaben identische Proteinsynthesemuster wie für die abgebildete 0-4 h Markierung. Das Gesamtprotein wurde extrahiert, in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (NEPHGE/SDS-Gradientengel 9-20 %) aufgetrennt (je 350.000 dpm) und fluorographisch sichtbar gemacht. Induzierte, differenzierungsspezifische Proteine sind mit Nummern (siehe Abb. 12) bzw. Buchstaben markiert. Das mit einem Pfeil gekennzeichnete Protein ist Aktin.

erfolgte zwar immer am 5. Hungertag, nicht aber zur gleichen Tageszeit, womit das nicht reproduzierbare Auftreten dieser Proteine erklärt werden könnte. Mit Molekulargewichten von 50000 bzw. 56000 dalton und ihrer Position relativ zum Aktin waren sie den in Wachstumsplasmodien charakterisierten α - und β -Tubulinen (Burland et al., 1983) sehr ähnlich (siehe auch 2.1.1). Das in den Kontrollplasmodien am stärksten markierte Produkt ist durch Bindung an Desoxyribonuklease I

als Aktin identifiziert worden (Abb. 10A, Protein mit einem Pfeil gekennzeichnet; Werenskiold, unveröffentlichte Ergebnisse). Aus dem Versuch in Abb. 10 geht hervor, daß die Aktinsynthese während der Morphogenese stark reduziert wird und nur mehr einen sehr geringen Anteil an der Gesamtsyntheseaktivität repräsentiert.

2.1.1 Identifizierung von zwei während der Sporulation induzierten Proteinen als Tubuline

Tubuline sind sehr konservative Proteine und haben die Tendenz, *in vitro* zu aggregieren (Borisy & Olmsted, 1972). Die Eigenschaft der Selbstaggregation kann für ihre Reinigung ausgenützt werden (Dentler et al., 1975). Die Tubulinkonzentration in *Physarum* Plasmodien ist aber zu gering, um durch wiederholte Zyklen von Selbstaggregation und Dissoziation eine Anreicherung zu ermöglichen. Die starke Konservierung der Tubulinstruktur in verschiedenen Organismen erlaubt jedoch eine Coaggregation von *Physarum* Tubulinen aus einem Gesamtproteinextrakt durch Zugabe von heterologem Tubulin in ausreichender Konzentration. Bei der anschließenden Aggregation wird das Plasmodientubulin in die heterologen Aggregate eingebaut und kann abzentrifugiert werden (Laffler et al., 1981). Die *in vivo* markierten Plasmodientubuline können durch Gelelektrophorese und autoradiographische Sichtbarmachung identifiziert werden. Dieser experimentelle Ansatz wurde hier verwendet.

Durch mehrere *in vivo* Markierungsexperimente während der Kulminationsphase, konnte der Zeitpunkt der maximalen Synthesestimulierung der vermutlichen Tubuline (Proteine 10 und 15 aus Abb. 10) auf 12 bis 13 h nach Induktionsbeginn eingeengt werden. Induzierte Plasmodien wurden daher während dieses Zeitraums mit [^{35}S]-Methionin *in vivo* markiert und die Proteine bei 0°C (Tubulindissoziation) mit PMG-Puffer (8 M Glycerin, 1 mM GTP, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 100 mM Pipes, pH 6.9) extrahiert. Anschließend wurde nicht markiertes, aus Schweinehirn isoliertes Tubulin, welches im

selben Puffer ohne Glyzerin gelöst war, dem Proteinextrakt im Verhältnis 1:1 zugesetzt (Endkonzentration an Tubulin: 2-3 mg/ml), und die Selbstaggregation durch Inkubation bei 37°C induziert. Die Anwesenheit von 4 M Glycerin beschleunigt die Selbstaggregation wesentlich, sodaß der Vorgang bereits nach etwa 30 min abgeschlossen ist (Dentler et al., 1975). Nach dem Abzentrifugieren der Aggregate wurden diese einem weiteren Dissoziations-Aggregationszyklus unterworfen, extrahiert und mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert. Abb. 11 zeigt Ausschnitte aus den entsprechenden Fluorographien. Zwei der in diesem Stadium bevorzugt markierten Proteine, in Abb. 11A mit T1 und T2 bezeichnet (identisch mit Protein 15 bzw. 10 aus Abb. 10), konnten auf diese Weise spezifisch abgereichert werden (vergl. Abb. 11A und 11C) und die in den Tubulinaggregaten enthaltene Radioaktivität wurde fast ausschließlich im Bereich des mit Coomassie Blau anfärbbaren Hirntubulins lokalisiert (Abb. 11D). Die Auswertung der IEF ergab einen isoelektrischen Punkt von etwa 5.3 (Abb. 11A).

Die verstärkte in vivo Tubulinsynthese in induzierten Plasmodien erfolgte nur in einem zeitlich eng begrenzten Stadium, zwischen 12 h und 13 h nach Induktionsbeginn. Dies ist der Zeitpunkt, zu dem die Venen des Plasmodiums bereits abgeschnürt sind und die Kulminationsphase beginnt (siehe Abb. 3). Für diese Stimulierung der Tubulinsynthese gibt es mindestens zwei mögliche Erklärungen. Erstens könnten die Tubuline für die Bildung des Spindelapparates bei einer für denselben Zeitpunkt postulierten Präsporenmitose (Sauer et al., 1969b) benötigt werden. Zweitens wäre es denkbar, daß den Tubulinen bei der intrazellulären Umstrukturierung während der Kulmination eine wichtige Aufgabe als Bestandteil des Cytoskeletts zukommt, zumal die Aktinsynthese gleichzeitig drastisch reduziert wird.

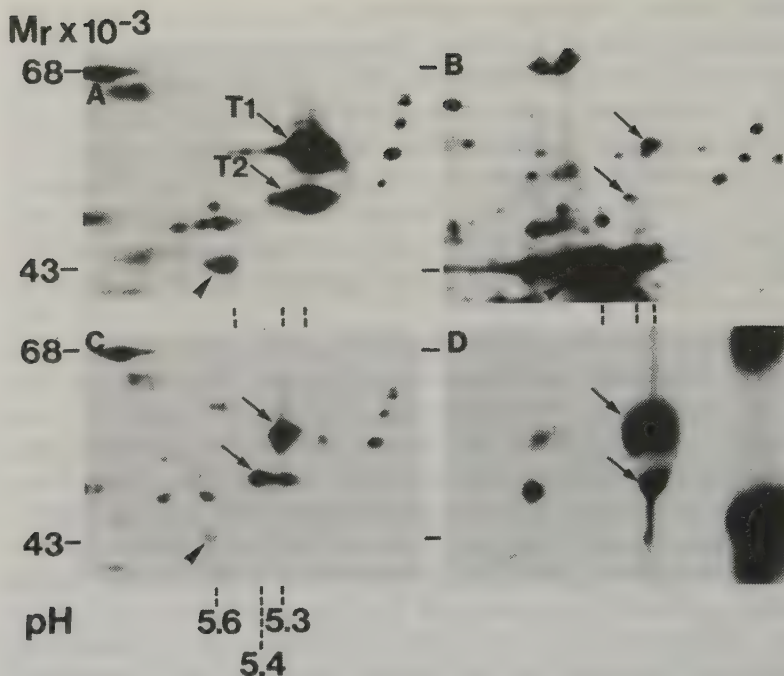


Abb. 11: Identifizierung von zwei sporulationsspezifischen Proteinen als Tubuline. Induzierte Plasmodien wurden während der Morphogenese von 12-13 h mit [35 S]Methionin in vivo markiert, die Proteine mit PMG-Puffer (siehe Methoden) extrahiert und auf zweidimensionalen Gelen aufgetrennt (IEF/SDS-Gradientengel 9-20 %). (A): Proteine aus induzierten Plasmodien, T = Tubulin, das Aktin ist mit einem Pfeil markiert. (B): Proteine aus nicht induzierten Kontrollplasmodien. Die in vivo Proteine aus (A) wurden 2 Aggregations-/Dissoziationszyklen mit isoliertem Schweinehirntubulin unterworfen. Die Proteine aus dem Überstand (C) wurden wie in (A) elektrophoretisch analysiert. Der Niederschlag (D) wurde in der 1. Dimension in einer NEPHGE aufgetrennt, da die IEF eine diffuse Auflösung der Proteine ergab.

2.2 Induktion sporulationsspezifischer mRNA-Spezies

2.2.1 Isolierung und zellfreie Translation von RNA aus morphologisch definierten Stadien der Sporulation

Im folgenden wurde untersucht, ob die Induktion sporulationsspezifischer Proteine auf einer Induktion der entsprechenden mRNA-Spezies beruht. Dazu wurde die RNA aus induzierten und Kontrollplasmodien isoliert und *in vitro* translatiert.

Während Gesamt-RNA, die nach der Guanidinium-SCN Methode extrahiert wurde, ohne weitere Behandlung im Retikulozytensystem translatiert werden konnte, war dies bei mit Phenol extrahierter RNA nicht möglich. Es zeigte sich auch, daß beim Aufschluß hungernder Makroplasmodien noch mehr Ribonukleaseaktivität freigesetzt wird als bei Mikroplasmodien oder wachsenden Makroplasmodien. Nur ein augenblicklicher Aufschluß in Gegenwart von 4 M Guanidinium-SCN oder Phenol ohne die geringste vorherige Verletzung des Plasmodiums führte zur Isolierung von intakter RNA.

Die Translationsprodukte der aus allen wichtigen Stadien der Fruchtkörperbildung gewonnenen RNA-Präparationen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht (Abb. 12). Das Produktmuster wies während der ersten 9 h nur geringfügige Veränderungen auf. Die nach etwa 10 h beginnende Morphogenese-phase ist hingegen durch den Ablauf eines sporulationsspezifischen, hochsynchronen Programms von Induktion und Verlust translatierbarer mRNA-Spezies charakterisiert. Parallel zum Verschwinden einiger für nicht induzierte Plasmodien charakteristischen translatierbaren mRNAs wurden in den induzierten Zellen eine Vielzahl neuer mRNA-Spezies nachgewiesen (Abb. 12, Proteine mit Pfeilen markiert). Ihr Auftreten konnte reproduzierbar mit distinkten morphologischen Stadien korreliert werden (siehe auch Schema in Abb. 15). Auffallend ist auch die fast völlige Abwesenheit

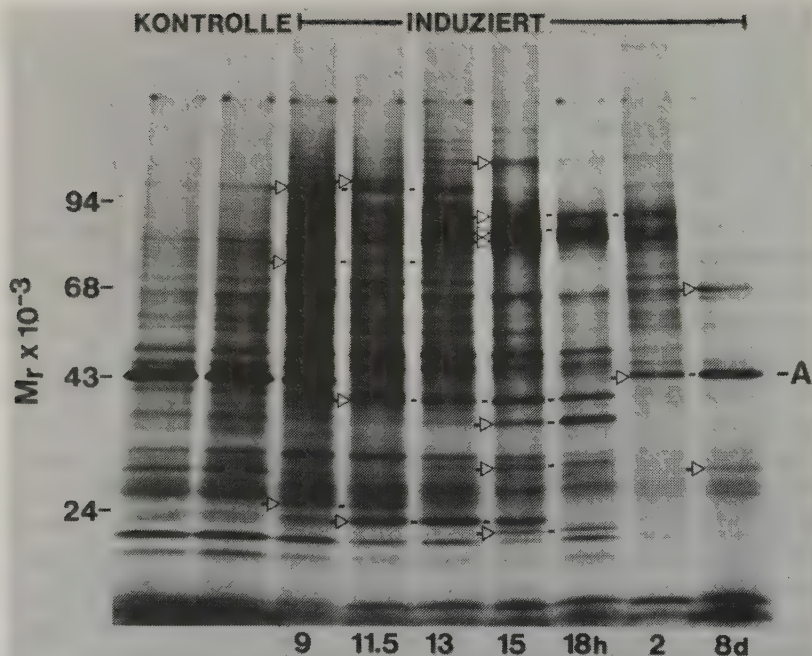


Abb. 12: Zeitliches Programm der Induktion sporulationsspezifischer mRNA-Spezies. Aus den verschiedenen Stadien der Fruchtkörperbildung (und aus 2 Kontrollplasmodien) wurde Gesamt-RNA isoliert und *in vitro* translatiert. Die Translationsprodukte wurden auf einem 5-20%igem SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt (350.000 dpm/Bahn) und fluorographisch sichtbar gemacht. Die stufenweise und transiente Induktion differenzierungsspezifischer mRNA-Spezies ist durch Pfeile angedeutet. Die Aktinbande ist mit einem "A" gekennzeichnet.

translatierbarer Aktin mRNA während der Morphogenese, wohingegen das Aktin in den Kontrollplasmodien und während der ersten 8 h nach Induktion die Hauptkomponente unter den Translationsprodukten darstellte. Es ist in Abb. 12 mit "A" gekennzeichnet und konnte durch Bindung an Desoxyribonuklease I als Aktin identifiziert werden (Werenskiöld, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Reduktion der

Aktinsynthese, wie sie bereits bei der *in vivo* Markierung beobachtet wurde (Abb. 10), ist also mit der An- bzw. Abwesenheit translatierbarer mRNA korrelierbar. Mit der entgültigen Reifung der Sporen erreicht die Menge an translatierbarer Aktin mRNA wieder annähernd das Niveau der Kontrollplasmodien. Dies war zu erwarten, wenn man bedenkt, daß die aus reifen Sporen keimenden Amöben motile Organismen sind und deshalb sicher einen hohen Bedarf an Aktin haben.

2.2.2 Anreicherung sporulationsspezifischer mRNA-Spezies

Von wenigen Ausnahmen abgesehen besitzen alle eukaryontischen mRNA-Moleküle an ihrem 3'-Ende eine mehr oder weniger lange poly(A)-Kette. Es gibt starke Hinweise dafür, daß das Ausmaß dieser poly-Adenylierung mit dem Alter der jeweiligen mRNA variiert (Chantrenne, 1977). Demnach weisen frisch transkribierte Moleküle eine lange poly(A)-Kette auf (etwa 160 Nukleotide), die relativ rasch auf ein mittleres Maß von ungefähr 60 Nukleotiden gekürzt wird. Wenn man davon ausgeht, daß die während der Sporulation neu translatierbaren mRNA-Spezies auch neu transkribiert oder zumindest in eine aktive Form überführt werden, dann sollten sie auf Grund ihrer längeren poly(A)-Kette durch Affinitätschromatographie anreicherbar sein. Im Rahmen eines Vergleichs der Translationsprodukte von Gesamt-RNA und poly(A)-RNA wurde daher versucht, die poly(A)-RNA nach Bindung an poly-U-Sephrose durch temperaturabhängige Elution in RNA-Moleküle mit unterschiedlicher poly(A)-Kettenlänge zu fraktionieren (Palatnik et al., 1981). Abb. 13 zeigt die Translationsprodukte der einzelnen Fraktionen im Vergleich zu einer unfraktionierten Probe. Die RNA wurde aus sporulierenden Plasmodien 15 h nach Beginn der Induktion präpariert. Es ist deutlich zu erkennen, daß alle induzierten mRNA-Spezies, die in diesem Stadium der Differenzierung besonders stark bzw. zum ersten Mal nachweisbar sind (vergl. auch Abb. 9, 15 h), erst bei den höheren Temperaturen eluiert werden. Hingegen sind mRNA-Spezies, die bereits zu Beginn der Induktion und

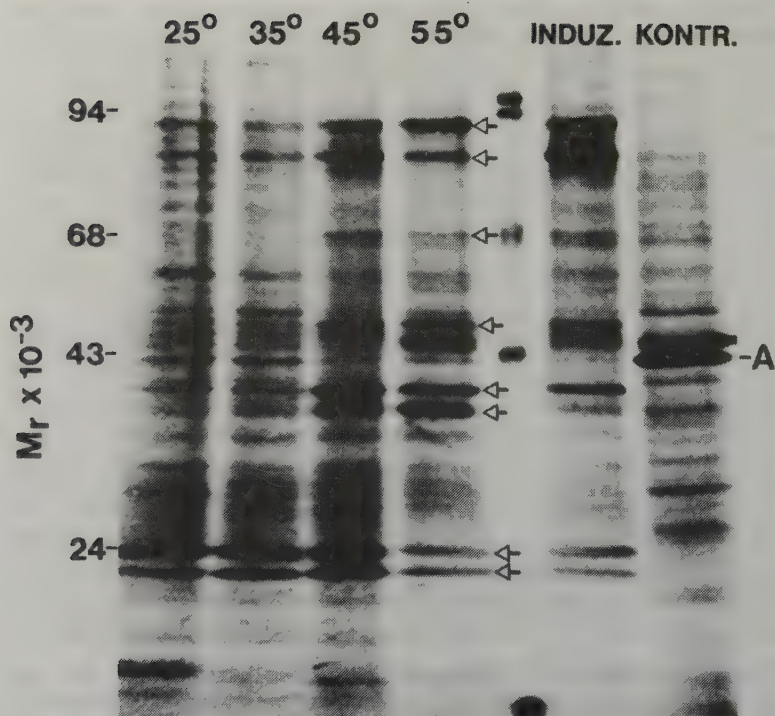


Abb. 13: Anreicherung sporulationsspezifischer mRNA-Spezies. Aus induzierten und Kontrollplasmodien wurde Gesamt-RNA isoliert, auf eine Poly(U)-Sepharose Säule aufgetragen (1 mg RNA/g Poly(U)-Sepharose) und die poly(A)-RNA durch thermische Elution in Fraktionen mit unterschiedlicher poly(A)-Kettenlänge fraktioniert. Die beiden rechten Bahnen zeigen die mit [35 S]methionin markierten *in vitro* Translationsprodukte der unfractionierten poly(A)-RNA ("A" = Aktin), die 4 linken Bahnen enthalten die 25°, 35°, 45° und 55°C poly(A)-RNA Fraktionen aus induzierten Plasmodien (SDS-Polyacrylamidgradientengel, 5-20 %). Die Translationsprodukte differenzierungsspezifischer mRNA-Spezies sind mit Pfeilen markiert.

auch in den Kontrollplasmodien gefunden wurden, wie etwa die mRNA des Aktins, hauptsächlich in den 25°C und 35°C Fraktionen zu finden, was einer poly-Adenylierung von etwa 20-40 Nukleotiden entspricht (Abb. 10, mit "A" bezeichnete Bande, Palatnik et al., 1981). Auch mRNA-Spezies, die 2-3 Stunden früher (also nach etwa 12 h) zum ersten Mal nachgewiesen worden waren, hatten größtenteils bereits eine deutlich gekürzte poly(A)-Kette (Abb. 10, die beiden etwa 24 kD großen induzierten Spezies, siehe auch Abb. 9). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß es sich bei den induzierten mRNA-Spezies um neutranskribierte Moleküle handelt.

2.2.3 Analyse der in vitro Translationsprodukte durch zweidimensionale Gelelektrophorese

Eine erste Charakterisierung in vitro translatierter Proteine differenzierungsspezifischer mRNA Präparationen auf einem SDS-Polyacrylamidgradientengel (Abb. 12) hatte gezeigt, daß während der Sporulation eine zeitlich genau programmierte, stadiumspezifische Induktion von translatierbaren mRNA-Spezies stattfindet. Da mit der eindimensionalen Gelelektrophorese eine eindeutige Zuordnung der Translationsprodukte nicht möglich war, wurden diese der besseren Auflösung wegen zweidimensional aufgetrennt. Für die erste Dimension wurde eine Nicht-Gleichgewichts-pH-Gradienten-Gelelektrophorese (NEPHGE) gewählt (O'Farrell et al., 1977). Da hierbei die Elektrophorese abgebrochen wird, bevor die basischen Moleküle das Gel verlassen, können mit dieser Methode auch Proteine erfaßt werden, deren isoelektrischer Punkt in dem bei isoelektrischen Fokussierungen meist instabilen pH-Bereich von >7.5 liegt. Gleichzeitig ist aber eine exakte Bestimmung des isoelektrischen Punktes nicht mehr möglich.

Abbildung 14 zeigt Ausschnitte aus Fluorographien der aufgetrennten in vitro Translationsprodukte von RNA aus den angegebenen Stadien (in Stunden seit Beginn der Induktion).

$M_r \times 10^{-3}$

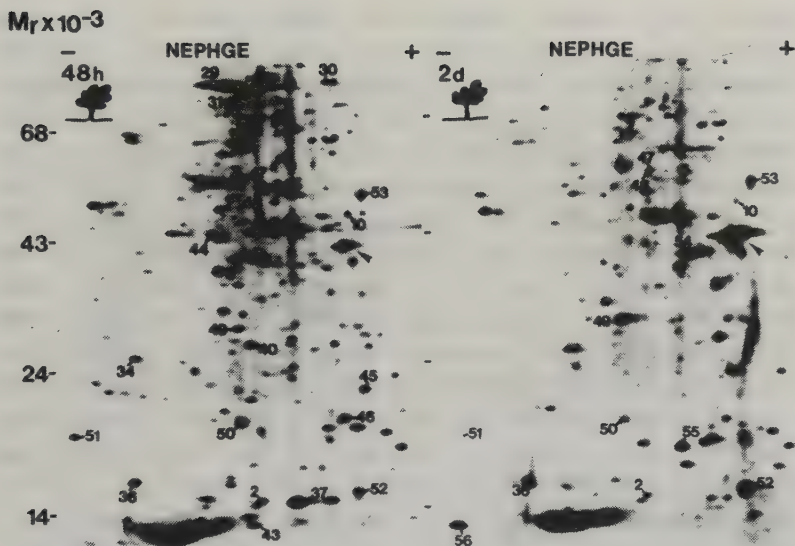



Abb. 14: Analyse der *in vitro* Translationsprodukte sporulationsspezifischer mRNA-Spezies. Gesamt-RNA aus verschiedenen Stadien der Sporulation (0 h/9 h/13 h/18 h/48 h/8 d nach Induktion) wurde isoliert und in Gegenwart von [35 S]Methionin *in vitro* translatiert. Die radioaktiv markierten Produkte wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese (NEPHGE/SDS-Gradientengel 9-20 %) analysiert. Entwicklungsregulierte mRNAs sind mit Nummern, das Aktin mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Alle induzierten Spezies sind mit Nummern gekennzeichnet. Bei einer detaillierten Analyse ließ sich folgendes feststellen:

Die Veränderungen auf mRNA-Ebene während der Morphogenese sind ungleich komplexer als es die eindimensionale Produktauftrennung vermuten ließ (vergl. Abb. 12 und 14). Insgesamt konnten vom Beginn der Induktion bis zur Ausbildung keimfähiger Sporen 56 neue oder in ihrer Synthese stark erhöhte mRNA-Moleküle nachgewiesen werden. Der weitaus

größte Teil davon, nämlich 43, wird bereits für die Morphogenese zwischen 9 und 18 h benötigt (Abb. 14, die Nummerierung der Produkte erfolgte in chronologischer Reihenfolge). Bis dahin ist die Fruchtkörperbildung abgeschlossen und es folgt nur mehr die von einer Meiose begleitete Reifung der Sporen (Laane & Haugli, 1976). In Abb. 15 ist das zeitliche Programm der Induktion sporulationsspezifischer mRNA-Spezies zusammengefaßt. Daraus ist ersichtlich, daß die verschiedenen Stadien der Differenzierung durch das Auftreten translatierbarer "mRNA-Familien", möglicherweise über die Aktivierung der entsprechenden Gene, charakterisiert sind. In Tabelle 2 sind die Translationsprodukte der prominentesten induzierten mRNA-Spezies mit ihrem Molekulargewicht und einer ungefähren Angabe des isoelektrischen Punktes aufgelistet:

Nr.	M _r (kD)	IP (pH)	Nr.	M _r (kD)	IP
1	32	6-6.5	26	21	> 7
10	50	5.3	29	87	7-8
11	49	6.4	31	85	7-8
13	23.5	> 7	37	14	5.5-6.5
15	56	5.3	45	24.5	4.5-5.5
17	35	4.5-5.5	52	16	4.5-5.5
18	32	4.5-5.5	53	57.5	4.5-5.5
25	43	7-8	56	13	>> 7

Es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen der Zahl der in vivo induzierten Proteine und der Zahl der durch zellfreie Translation nachgewiesenen induzierten mRNA-Spezies (vergl. Abb. 10B und 14). Dabei ist einerseits zu berücksichtigen, daß die in vivo Markierung nur den Zeitraum zwischen 11 und 17 h umfaßte, andererseits konnten bei Pulsmarkierungen, die sich nur über wenige Stunden innerhalb desselben Zeitraums erstreckten, mindestens 5 weitere mit in vitro Translationsprodukten nach elektropho-

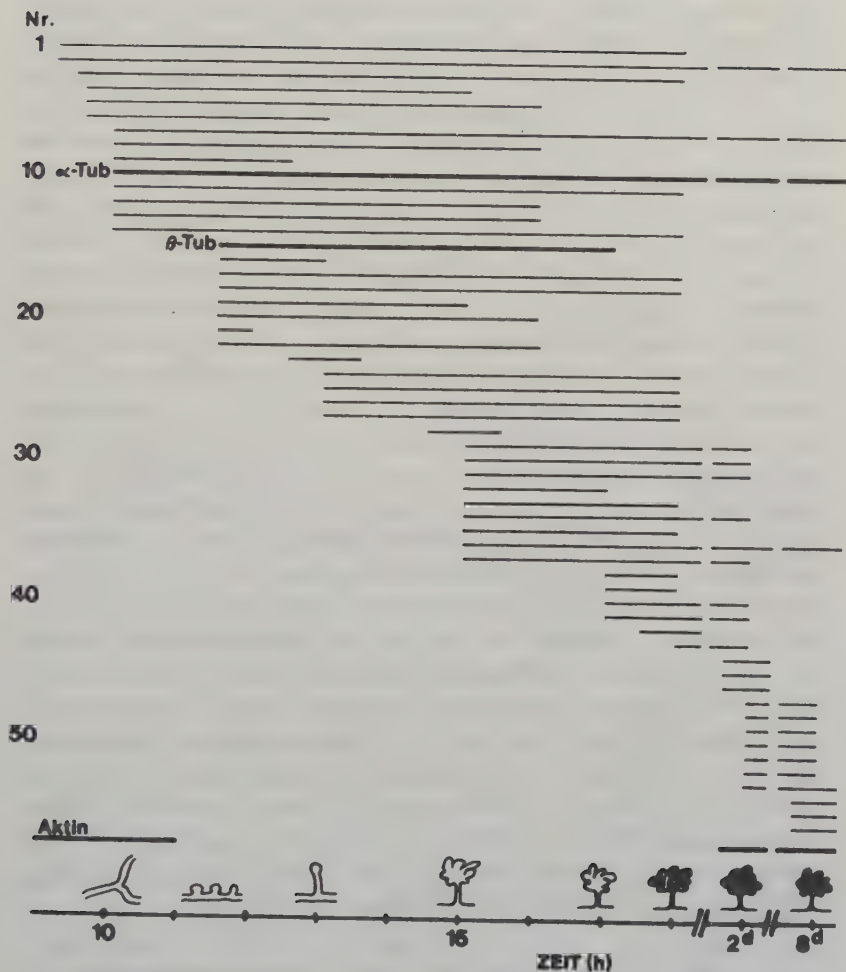


Abb. 15: Zeitliches Programm der Induktion sporulationsspezifischer mRNA-Spezies. RNA-Präparationen aus verschiedenen Stadien der Entwicklung wurden *in vitro* translatiert und wie im Experiment von Abb. 14 analysiert. Die Serie von Fluorographien wurde mit Hinsicht auf die An- bzw. Abwesenheit einzelner Translationsprodukte ausgewertet. Die Nummerierung entspricht derjenigen in Abb. 14.

retischen Kriterien identische Proteine erfaßt werden. Trotz der hohen Übereinstimmung zwischen in vivo und in vitro Produkten - 8 von 11 in vivo induzierten Proteinen konnten einem in vitro synthetisierten Protein zugeordnet werden (Abb. 10B, Proteine mit Nummern gekennzeichnet) - wurden dennoch mehr als doppelt so viel induzierte mRNA-Spezies gefunden. Eine mögliche Erklärung wäre, daß es sich bei einigen von ihnen um Moleküle handelt, die in der intakten Zelle für die Sporulation nicht oder nur in geringem Ausmaß benötigt werden und etwa als translationsinaktive Ribonukleoproteinkomplexe vorliegen. Solche Strukturen werden aber höchstwahrscheinlich durch Behandlung mit 4 M Guanidinium-SCN dissoziiert, womit die solcherart freigesetzten mRNA-Moleküle einer in vitro Translation zugänglich wären. Außerdem könnten die entsprechenden in vivo Produkte einem raschen Turnover unterliegen, sodaß die niedrigen Gleichgewichtskonzentrationen mit den verwendeten Methoden nicht mehr nachweisbar wären.

Der Gehalt an translatierbarer Aktin mRNA erreicht nach 18 h ein Minimum und steigt im Verlauf der Sporenreifung wieder auf das Niveau der Kontrollplasmodien (Abb. 14).

Zwei der in Abb. 14 gezeigten in vitro Translationsprodukte traten verstärkt während der Kulminationsphase auf (13 h, Proteine 10 und 15) und verhielten sich nach gelelektrophoretischen Kriterien ähnlich den in vivo identifizierten Tubulinen. Deswegen wurde im folgenden versucht, den Nachweis zu erbringen, daß es sich bei diesen in vitro synthetisierten Produkten um Tubuline handelt.

2.2.4 Identifizierung der in vitro Translationsprodukte 10 und 15 als Tubuline

Aus induzierten Plasmodien, die sich in der Kulminationsphase befanden (etwa 12 h nach Belichtung), wurde RNA isoliert und in Anwesenheit von [35 S]Methionin in vitro translatiert. Anschließend wurden aus dem Translationsansatz nach Zugabe von gereinigtem Hirntubulin die in vitro

synthetisierten Plasmodientubuline durch Selbstaggregation ausgefällt. Überstand und Niederschlag wurden durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert. In Abb. 16 sind die entsprechenden Fluorographien dargestellt. Daraus lassen sich folgende Aussagen entnehmen:

1) Zwei translatierbare mRNA-Spezies sind im gezeigten Gelausschnitt in ihrer Konzentration im Vergleich zu den Kontrollplasmodien stark erhöht (vergl. Abb. 16A und 16B, Proteine mit T1 und T2 bezeichnet). Die Translationsprodukte setzen sich dabei jeweils aus mindestens 2 Proteinen zusammen. Diese Mikroheterogenität deutet darauf hin, daß möglicherweise jeweils mehr als eine mRNA-Spezies beteiligt ist.

2) Durch Coaggregation mit heterologem Hirntubulin konnten die radioaktiv markierten Translationsprodukte selektiv aus der Lösung abgereichert (Abb. 16C) und im Niederschlag angereichert werden (Abb. 16D). Aufgrund ihres Molekulargewichtes und isoelektrischen Punktes handelt es sich wahrscheinlich um Tubuline vom α - bzw. β -Typ, wie sie von anderen Autoren in wachsenden Plasmodien beschrieben worden sind (Burland et al., 1983).

3) Es besteht eine zeitliche Korrelation zwischen der in vivo Synthese der Tubuline und dem Auftreten ihrer mRNA-Moleküle. Die Induktion der translatierbaren mRNAs und die Stimulierung der Tubulinsynthese erfolgen in dieser Phase (12-13 h) synchron. Das geht aus einem Vergleich von Abb. 11A mit Abb. 16A hervor. Auch die Mikroheterogenität der Produkte ist bei in vitro und in vivo synthetisierten Proteinen gleich (T1 und T2 setzen sich jeweils aus mindestens 2 Proteinspezies zusammen). Lediglich die Intensitäten der einzelnen Produkte, die unter T2 zusammengefaßt sind, scheinen umgekehrt zu sein (vergl. Abb. 16A und Abb. 11A, Proteine mit T2 markiert).

Die kurzfristige Stimulierung der Tubulinsynthese beruht also auf der Induktion der entsprechenden mRNA-Moleküle und läßt sich am ehesten mit einer Beteiligung am Spindelapparat bei einer im selben Stadium durch [^3H]Thymidin-Einbaumes-

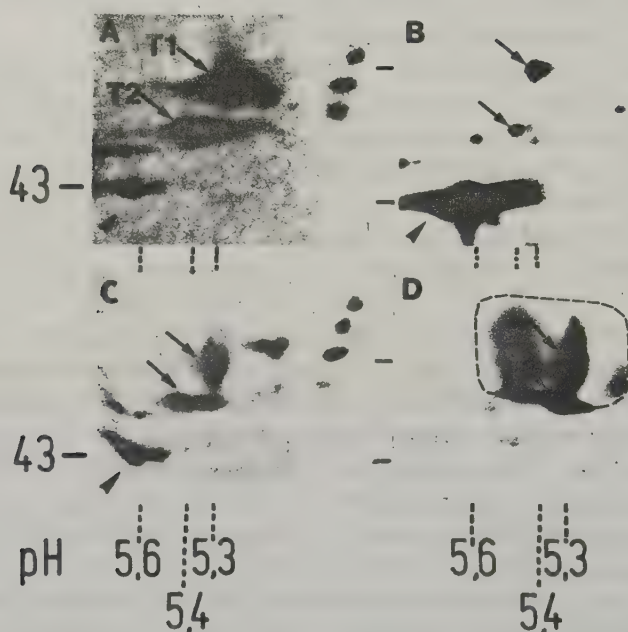
$\text{Mr} \times 10^{-3}$


Abb. 16 Induktion von T1 und T2 Tubulin mRNAs. Gesamt-RNA aus sporulierenden Plasmodien 13 h nach Induktion (A) und aus Kontrollplasmodien (B) wurde isoliert und in Gegenwart von [35 S]Methionin in vitro translatiert. Die Produkte wurden in einem zweidimensionalen Gelsystem (IEF/SDS-Gradientengel 9-20 %) analysiert und fluorographisch sichtbar gemacht. Die in vitro synthetisierten Proteine aus (A) wurden 2 Aggregations-/Dissoziationszyklen mit isoliertem Schweinehirntubulin unterworfen. Überstand (C) und Niederschlag (D) wurden wie in (A) elektrophoretisch aufgetrennt. Man beachte die relative Abnahme der T1 und T2 Konzentration in (C). Die in (D) gezeigten Proteine waren die einzigen auf dem Gel. Die gestrichelte Linie markiert das mit Coomassie Blau angefärbte Carriertubulin. Das Aktin ist mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

sungen bestimmten Präsporenmitose erklären (Sauer et al., 1969b). Es wäre aber auch denkbar, daß den Tubulinen während der Kulminationsphase eine wichtige Funktion beim Aufbau des Cytoskeletts zukommt, obwohl man dafür eine etwas längerfristige Stimulierung der Tubulinsynthese erwarten würde.

2.3 Untersuchung der Regulation einer sporulationsspezifischen mRNA-Spezies mit einer clonierten cDNA als Hybridisierungsprobe

2.3.1 Synthese einer sporulationsspezifischen cDNA

Die in vitro Translationsexperimente hatten gezeigt, daß die Morphogenese während der Sporulation von der Induktion stadiumspezifischer translatierbarer mRNA-Spezies begleitet wird. Daraus konnte aber nicht abgeleitet werden, ob es sich wirklich um das Auftreten neuer mRNA-Moleküle oder nur um die Aktivierung bereits vorhandener mRNA-Spezies handelt. Um diese Frage der An- und Abwesenheit eines bestimmten Moleküls zu klären, war eine spezifische Hybridisierungsprobe erforderlich. Eine hierfür geeignete Methode ist die cDNA-Clonierung, bei der die mRNA enzymatisch in DNA revers transkribiert wird, die nach Verpackung in ein Plasmid für die Transformation von *E. coli* verwendet wird.

Es wurde daher poly(A)-RNA aus sporulierenden Plasmodien gegen Ende der Kulminationsphase (etwa 14-15 h nach Beginn der Induktion) isoliert. Zu diesem Zeitpunkt waren besonders viele induzierte mRNA-Spezies durch in vitro Translation nachweisbar. Unter Verwendung von Reverser Transkriptase und oligo(dT) als Initiator wurde die poly(A)-RNA in cDNA umgesetzt und durch Homopolymerligation in die Pst I--Schnittstelle im Ampicillingen des Plasmids pBR 322 eingesetzt. Nach Transformation des *E. coli* Stamms RR 1 wurden alle Amp⁻ und Tet⁺ Clone durch differentielle Koloniehybridisierung mit endmarkierter poly(A)-RNA aus Wachstums-, induzierten und Kontrollplasmodien auf sporulationsspezifische cDNA-Insertionen hin getestet. Dabei konnten insgesamt 10 Clone gefunden werden, die ein cDNA-Insert trugen, welches spezifisch mit [³²P]-markierter poly(A)-RNA aus induzierten, nicht aber mit der aus

Kontroll- und Wachstumasmodien hybridisierte. In Abb. 17 ist als Beispiel eine differentielle Koloniehybridisierung für die Kolonien 1-82 gezeigt.

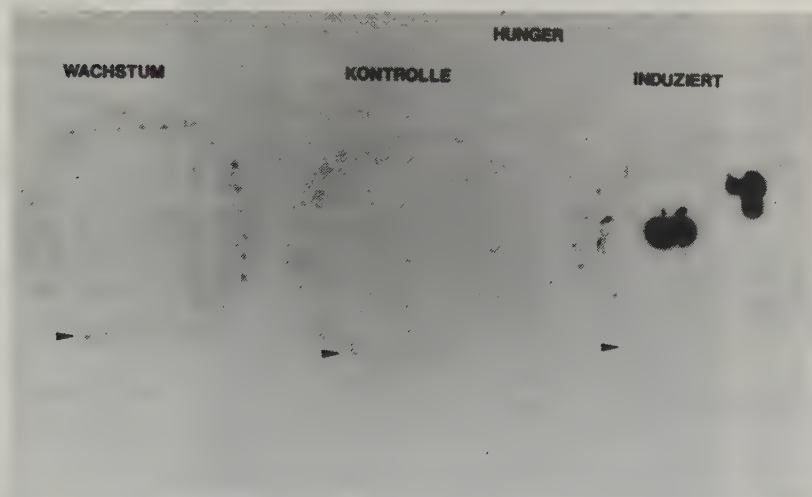


Abb. 17: Differentielle Koloniehybridisierung. Amp⁻ und Tet⁺ Clone wurden auf Nitrocellulosefilter ($\Phi = 8$ cm) mit endmarkierter poly(A)-RNA aus Wachstumasmodien, induzierten und Kontrollplasmodien in 50 % Formamid, 5x SSPE bei 42°C 50 h hybridisiert (jeweils 4×10^6 cpm für maximal 5 Filter). Die Filter wurden 2x 30 min mit 1x SSC, 0.1 % SDS bei 68°C gewaschen. Die unterste Reihe (mit Pfeil markiert) enthielt jeweils Amp⁺ Kolonien, deren Plasmid kein cDNA-Insert trug.

Aus den auf diese Weise selektierten Kolonien wurde Plasmid isoliert und einer Restriktionsanalyse unterworfen. Dabei stellte sich heraus, daß alle Plasmide aus nicht bekannten Gründen eine 700 bp Deletion zwischen der Pst I- und Eco R I-Schnittstelle (inklusive) aufwiesen. Dies wurde durch eine Restriktionsanalyse gezeigt, bei der sich herausstellte, daß sowohl die Pvu I- als auch die Eco R I-Schnittstelle nicht vorhanden sind. Es war daher

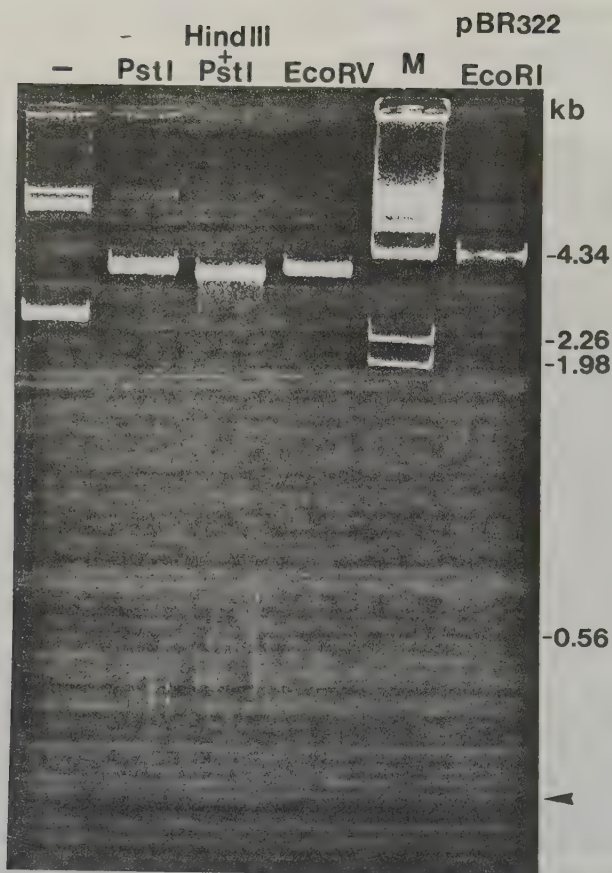


Abb. 18: Restriktionsanalyse des rekombinanten Plasmids aus Clon 38. Plasmid aus jeweils 1 ml Übernachtskultur (etwa 2 µg) wurde mit Pst I, Pst I + Hind III und Eco R V geschnitten und auf einem 2 % Agarosegel analysiert. Zusätzlich wurde das ungeschnittene Plasmid 38 sowie ein mit Eco R I geschnittenes Plasmid pBR 322 mitaufgetragen. Als Längenstandard (M) wurde eine mit Hind III geschnittene DNA des Phagen λ verwendet. Das mit Pst I + Hind III herausgeschnittene cDNA-Insert (siehe Text) ist etwa 250 bp lang (mit Pfeil markiert).

notwendig, die cDNA-Inserts durch Restriktion mit Pst I und Hind III bzw. Cla I herauszuschneiden, da die zweite Pst I-Schnittstelle, die normalerweise bei dieser Clonierungsmethode erzeugt wird, nicht mehr vorhanden war. Eine Restriktionsanalyse des Plasmids aus Clon 38, der für alle weiteren Experimente verwendet wurde, ist in Abb. 18 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß das Plasmid 38 trotz einer cDNA-Insertion kürzer als das normale Plasmid pBR 322 ist und höchstwahrscheinlich nur eine Pst I-Schnittstelle enthält, da auch das mit Eco R V linearisierte Plasmid 38 die gleiche Größe hat (pBR 322 hat nur eine Schnittstelle für Eco R V). Die Länge des mit Pst I und Hind III herausgeschnittenen cDNA-Inserts betrug 250 bp, wobei die von Hind III erkannte Sequenz 29 Basenpaare neben der nicht mehr vorhandenen Eco R I-Schnittstelle liegt.

2.3.2 Identifizierung des cDNA-Clons 38 durch hybridselektionierte in vitro Translation

Die Koloniehybridisierung deutete bereits darauf hin, daß das Plasmid 38 ein cDNA-Fragment enthält, das von einer während der Sporulation induzierten mRNA stammt. Da jedoch während der Morphogenese mindestens 43 neu translatierbare mRNA-Spezies nachgewiesen worden waren, stellte sich die Frage nach der Identität der für die cDNA als Matrice fungierenden mRNA. Dazu wurde das Plasmid an Nitrocellulose gebunden und mit poly(A)-RNA aus induzierten Plasmodien hybridisiert. Die unspezifisch gebundene RNA wurde anschließend gewaschen und die spezifisch hybridisierte RNA durch Denaturierung des DNA-RNA Hybrids freigesetzt, gefällt und für die *in vitro* Translation eingesetzt. Die Translationsprodukte wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgradientengel analysiert. Es stellte sich heraus, daß die selektionierte mRNA für ein 49 kD Protein codierte (Abb. 19A). Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnte diese mRNA schließlich eindeutig dem sporulationsspezifischen Protein 11 zugeordnet werden (Abb. 19B und

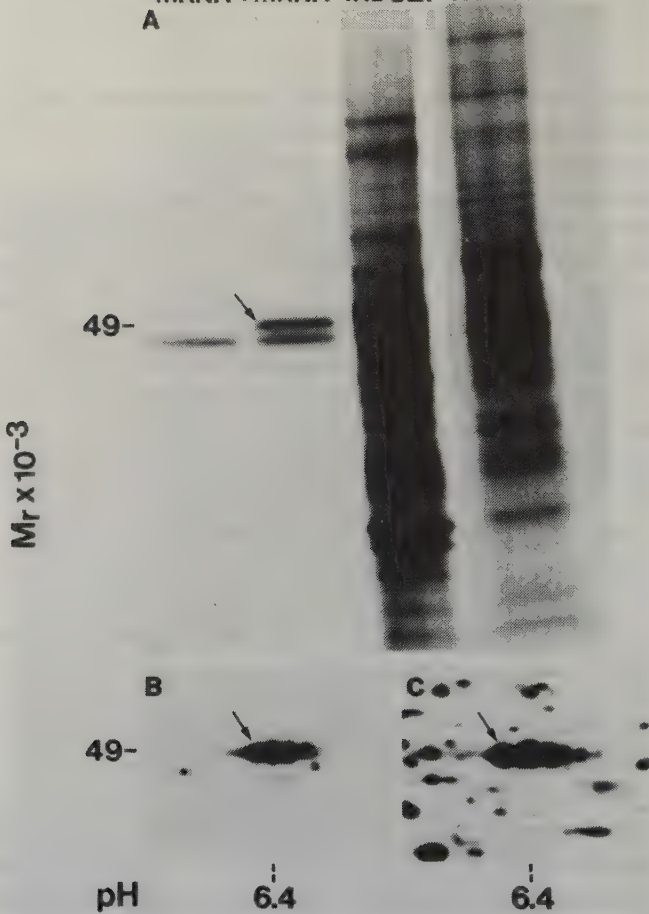


Abb. 19: Identifizierung des cDNA-Inserts aus Plasmid 38 durch hybridselektionierte Translation. 20 μg Plasmid wurden auf einem 3x3 mm großen Nitrocellulosefilter fixiert und mit 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly(A)-RNA aus induzierten Plasmodien (14 h nach Induktion) in 65 % Formamid 3 h bei 50°C hybridisiert. Nach dem Waschen des Filters (65°C, 0.15 M NaCl) wurde die spezifisch hybridisierte mRNA durch Erhitzen des Filters in H₂O (100°C, 1 min) gelöst, nach Zugabe von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA als Carrier mit 3 Vol. Ethanol gefällt und im Reticulocytensylat in Gegenwart von [³⁵S]Methionin in vitro translatiert. (A): SDS-Gradientengel 5-20 %, Man beachte in Bahn zwei das 49 kD große Translationsprodukt der selektierten mRNA (mit Pfeil markiert); Zusätzlich sind wie angegeben aufgetragen: In vitro Translationsprodukte von Gesamt-RNA aus induzierten und Kontrollplasmodien, sowie ein Translationsansatz ohne zugegebene mRNA. (B): 2D-Elektrophorese (IEF/SDS-Gradientengel), in vitro Translationsprodukt der selektierten mRNA. (C): Translationsprodukte von Gesamt-RNA aus induzierten Plasmodien.

C), welches bei der *in vitro* Translation (Abb. 14), bei der *in vivo* Markierung (Abb. 10) und bei der Coomassie-Anfärbung extrahierter *in vivo* Proteine (nicht gezeigt) als prominente Spezies in Erscheinung trat. Dabei handelte es sich jedesmal um eine Gruppe von 3-5 Proteinen, die sich in ihren isoelektrischen Punkten, nicht aber im Molekulargewicht unterschieden. Dies läßt normalerweise auf eine posttranslationale Modifikation eines Proteins durch Phosphorylierung oder andere geladene Gruppen schließen. Da aber bei der *in vitro* Translation im heterologen System dasselbe Produktmuster wie *in vivo* gefunden wurde, könnten auch mehrere verwandte mRNA-Spezies involviert sein.

2.3.3 "Northern blot" Analyse mit Plasmid 38 als Hybridisierungsprobe

Nachdem nun eine sporulationsspezifische Hybridisierungsprobe zur Verfügung stand, konnte auch der Frage nachgegangen werden, ob die Translatierbarkeit im Reticulocytensystem der für das Protein 11 codierenden mRNA mit der An- bzw. Abwesenheit der mRNA-Moleküle korreliert ist. poly(A)-RNA aus induzierten und Kontrollplasmodien wurde in einem denaturierenden Formaldehydgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem radioaktiv markierten Plasmid 38 hybridisiert. In Abb. 20 ist die entsprechende Autoradiographie gezeigt.

Neben der dominanten 1.6 kb Bande, die höchstwahrscheinlich die funktionelle, translationsaktive Form der mRNA darstellt, wurden noch 3-4 zusätzliche Banden mit höherem Molekulargewicht gefunden. Das 1.6 kb große mRNA-Molekül, welches bei einer Proteingröße von 49 kD zu rund 70 % aus codierenden Sequenzen besteht, war offensichtlich in induzierten Plasmodien in wesentlich höherer Konzentration vorhanden als in den Kontrollplasmodien, wo es erst nach verlängerter Exposition nachgewiesen werden konnte (Abb. 20, Bahn K). Die Auswertung der Filmschwärzung mit einem Gelscanner ergab einen Unterschied um den Faktor 20. Dieses

Experiment bestätigte, daß die stark differierende in vitro

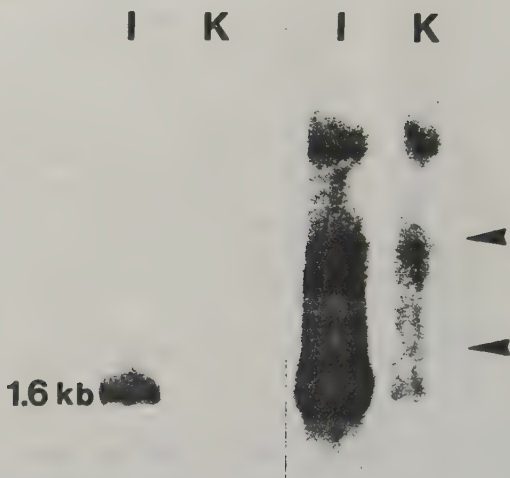


Abb. 20: Induktion der mRNA des Sporenproteins 11 während der Morphogenese. Poly(A)-RNA aus induzierten Plasmodien (I, 15 h nach Belichtung) und aus Kontrollplasmodien (K) wurde in einem 2%igen Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt. Die RNA wurde auf Nitrocellulose übertragen und mit dem radioaktiv markierten Plasmid 38, das ein für das Sporenprotein 11 spezifisches 250 bp cDNA-Insert enthält, 50 h in 50 % Formamid, 5x SSPE bei 42°C hybridisiert. Die in der RNA aus induzierten Plasmodien stark hybridisierende Bande (1.6 kb) war in der Kontroll-RNA erst nach längerer Autoradiographie nachweisbar. Die Position der ribosomalen RNA-Banden ist mit Pfeilen markiert.

Translatierbarkeit von Protein 11 in RNA-Präparationen aus sporulierenden und nicht induzierten Plasmodien mit Veränderungen in der Synthese des reifen mRNA-Moleküls erklärt werden kann. Durch Waschen des Filters (5 min bei 100°C in H₂O) und anschließende erneute Hybridisierung mit einem Plasmid, welches eine Teilsequenz eines ribosomalen Gens aus *Physarum* enthielt, konnte gezeigt werden, daß es

sich bei diesen Banden nicht um Transkripte ribosomaler Gene handelt. Die auf diese Weise ermittelte Position der 19 S und 26 S ribosomalen RNA-Banden ist in Abb. 20 mit Pfeilen markiert. Dies ließ den Schluß zu, daß es sich bei den hybridisierenden, höhermolekularen Transkripten um Vorläufermoleküle der aktiven mRNA handelt. Diese waren in der poly(A)-Fraktion von induzierten und Kontrollplasmodien in fast gleicher Konzentration vertreten (Abb. 20). Da die hohe Konzentration an reifer mRNA in induzierten Plasmodien nicht durch Processing von in Kontrollplasmodien angehäuften Vorläufermolekülen erklärt werden kann, legt dies den Schluß nahe, daß die mRNA neu transkribiert wurde. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Vorläufermoleküle in der nicht poly(A)-haltigen RNA-Fraktion vorhanden sind. Dies ist aber nicht sehr wahrscheinlich, da auch die poly(A)-RNA noch zu etwa 50 % ribosomale RNA enthält und somit zumindest ein Teil dieser Vorläufermoleküle unspezifisch an die poly(U)-Sepharose binden und nachzuweisen sein sollte. Bei einem analogen Experiment mit Gesamt-RNA konnte keine Hybridisierung erhalten werden, wahrscheinlich als Folge einer zu niedrigen Konzentration der gesuchten mRNA. Deshalb ließ sich auch nicht definitiv ausschließen, daß die mRNA in Form nicht adenylierter Vorläufermoleküle angehäuft und bei Bedarf prozessiert wird.

2.3.4 Untersuchungen zur Organisation des für das Protein 11 codierenden Gens im Chromosom

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, daß die sporulationsspezifische Induktion des Proteins 11 auf der Ebene der Transkription, oder durch unterschiedliches Processing der hnRNA reguliert wird. Es wurde daher versucht, einige Informationen über die Organisation des betreffenden Gens zu erhalten, und mögliche differenzierungsabhängige Veränderungen auf DNA-Ebene aufzuzeigen. Die folgenden Experimente wurden sowohl mit der bisher verwendeten weißen Mutante des diploiden Stammes

LU (897 X 898) als auch mit dem haploiden CL-Stamm durchgeführt. Kontrollexperimente hatten gezeigt, daß die in vivo und in vitro Proteinsynthesemuster während der Sporulation identisch sind. Wegen der einfacheren Interpretierbarkeit, die sich aus der Abwesenheit verschiedener Allele ergibt, werden hier nur die Ergebnisse mit dem haploiden Stamm präsentiert.

Die DNA aus Zellkernen wurde isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen ("Southern blot") und mit dem in Anwesenheit von [32 P]Nukleotiden nick-translatierten Plasmid 38 hybridisiert. In die Analyse wurde auch DNA aus Wachstumsplasmodien mit einbezogen, da eventuelle Genumlagerungen oder Modifikationen bereits beim Übergang in den Hungerzustand und nicht erst nach der Lichtinduktion sporulationskompetenter Plasmodien auftreten könnten. Im ersten Teil des Experiments wurde die DNA aus 2 Tage gewachsenen Plasmodien, aus induzierten Plasmodien in der Kulminationsphase und nicht induzierten Kontrollplasmodien isoliert und mit den Restriktionsenzymen Bam H I, Hind III und Eco R I gespalten. Diese Enzyme erkennen jeweils spezifische 6er-Sequenzen und erzeugen daher relativ große Fragmente. Die Autoradiographie von der Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Plasmid 38 ist in Abb. 21 gezeigt. Die durchgehende Bande von 4.5 kb ist auf eine unspezifische Hybridisierung mit dem Plasmid pBR 322 zurückzuführen. Dies zeigte sich bei einer Kontrollhybridisierung, in der die nukleäre DNA mit Bam H I, Hind III, Eco R I, Hpa II, Msp I, Mbo I und Sau 3AI geschnitten und mit dem radioaktiv markierten pBR 322 hybridisiert wurde. Dabei wurde in allen Fällen unverändert dieselbe Bande bei 4.5 kb gefunden. Es handelt sich hier wahrscheinlich um ein extrachromosomales Element. Darauf wird weiter unten ausführlich eingegangen (siehe Abb. 23). Alle anderen Banden, mit Ausnahme der 5.2 kb Fragmente bei den Bam H I Restriktionen, hybridisier-



Abb. 21: Analyse der chromosomalen Organisation des für das Sporenprotein 11 codierenden Gens in verschiedenen Stadien. Nukleäre DNA aus wachsenden, hungernden und induzierten Plasmodien wurde mit den Restriktionsenzymen Bam H I, Hind III und Eco R I geschnitten und die Fragmente in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Plasmid 38 (5×10^6 cpm) wurde in 50 % Formamid, 5x SSPE 50 h bei 42°C durchgeführt. Die Hybridisierungen wurden 2x 30 min mit 0.2x SSPE bei 65°C gewaschen. Man beachte die beiden Bam H I bzw. Hind III Fragmente in der Wachstums-DNA (mit Pfeilen markiert). Sie sind größer als die entsprechenden Fragmente der DNA aus hungernden Plasmodien. Die durchgehende Bande von 4.5 kb wird im Text erläutert.

ten nicht mit dem Plasmid pBR 322 (o. Abb.) und enthielten daher das gesuchte Gen. Es konnte also bei allen Restriktionen je ein DNA-Fragment nachgewiesen werden, welches spezifisch mit dem cDNA-Insert hybridisierte. Dieses Bandenmuster ist charakteristisch für ein nur in einer Kopie vorliegendes Gen. Während unter Hungerbedingungen in den induzierten und Kontrollplasmidien die entsprechenden Fragmente jeweils gleich groß waren (Abb. 21, etwa 10 kb bei Restriktion mit Hind III und Eco R I, 3.3 kb im Fall von Bam H I), wiesen die hybridisierenden Fragmente der aus Wachstumsplasmidien isolierten DNA in zwei Fällen deutlich höhere Molekulargewichte auf (Abb. 20, Banden mit Pfeilen markiert). Da bei der Fragmentierung mit Eco R I kein Unterschied im Molekulargewicht des hybridisierenden DNA-Stücks zwischen Wachstum und Hunger festgestellt werden konnte, liegt es nahe, eine Modifizierung der DNA durch Methylierung anzunehmen, indem einige Schnittstellen in Wachstumsplasmidien spezifisch methyliert und damit inaktiviert sind. Um die Enzymaktivität zu hemmen, müßte im Fall von Bam H I ein Cytidin, im Fall von Hind III ein Adenin methyliert werden. Bislang wurde in *Physarum* nur das Vorkommen von 5-Methylcytidin nachgewiesen (Evans & Evans, 1970), was jedoch das Vorkommen geringer Mengen von 6-Methyladenin nicht ausschließt. Denkbar wäre auch eine Umlagerung des Gens in eine andere Umgebung des Chromosoms, wobei beide Eco R I Schnittstellen innerhalb des umgelagerten DNA-Abschnittes liegen müßten.

2.3.5 Analyse des für Protein 11 codierenden Gens mit Hinsicht auf DNA-Methylierung

Da die DNA-Methylierung bei Eukaryonten in zunehmendem Maße in Zusammenhang mit einer Regulation der Transkription diskutiert wird, wurde die DNA aus Wachstums-, induzierten und Kontrollplasmidien auch auf eine spezifische differenzierungsabhängige Methylierung der DNA hin untersucht. Dies war nur in sehr begrenztem Ausmaß möglich,

da es bislang nur wenige Kombinationen von Restriktionsenzymen gibt, die als "Sonden" dafür in Frage kommen. Es wurden in diesem Experiment die Isoschizomeren Hpa II/Msp I und Mbo I/Sau 3AI eingesetzt. Die ersten beiden Enzyme erkennen die Sequenz CCGG, wobei Hpa II nicht schneidet, wenn das innere C methyliert ist, und Msp I nicht, wenn das äußere C methyliert ist. Sind beide Cytosinreste methyliert, schneiden weder Hpa II noch Msp I. Die chromosomale DNA wurde mit beiden Enzymen gespalten, die Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem in Gegenwart von [³²P]Nukleotiden nick-translatierten Plasmid 38 hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abb. 22 gezeigt (die ersten 6 Bahnen von links). Neben der Bande bei 4.5 kb, die eine unspezifische Hybridisierung darstellt, und weiter unten behandelt wird, trat nur bei den induzierten Plasmodien ein DNA-Fragment bei 0.6 kb auf, und zwar sowohl bei der Restriktion mit Hpa II als auch mit Msp I. Daraus konnte geschlossen werden, daß in wachsenden und hungernden, nicht induzierten Plasmodien, in denen das sporulationsspezifische Protein 11 nicht synthetisiert wird, dieses Fragment stark methyliert ist. Dagegen lag derselbe DNA-Abschnitt in sporulierenden Plasmodien, in denen das Protein 11 spezifisch induziert wird, in zumindest teilweise demethyliertem Zustand vor (siehe auch Diskussion). Diese Demethylierung der DNA im Anschluß an die Lichtinduktion erfolgte in gleichmäßiger Weise an beiden Cytosinresten, was aus der ähnlichen Intensität der 0.6 kb Bande in der mit Hpa II und Msp I fragmentierten DNA ersichtlich ist.

Eine analoge Restriktionsanalyse wurde auch mit den Isoschizomeren Mbo I und Sau 3AI durchgeführt. Diese beiden Restriktionsenzyme erkennen die Sequenz GATC, wobei Mbo I durch eine Methylierung des Adenins inhibiert und Sau 3AI davon nicht beeinflusst wird. Es gibt jedoch starke Hinweise, daß eine Methylierung am Cytosin die Aktivität von Sau 3AI hemmt (Vogelsang, unveröffentlichte Ergebnisse). Ein ähnlicher Unterschied wie bei der C-Methylierung zwischen wachsenden und hungernden Plasmodien einerseits und

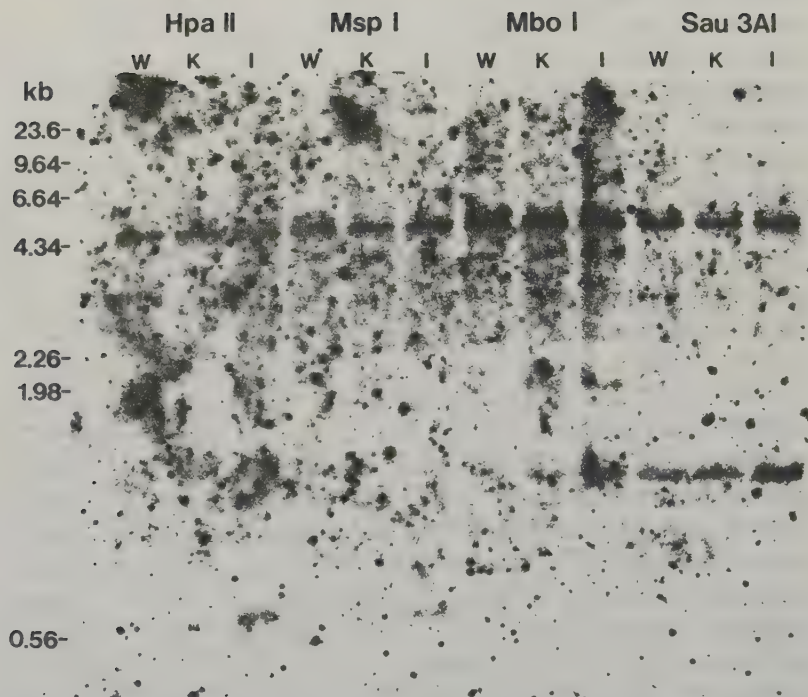


Abb. 22: Untersuchung des für das Sporenprotein 11 codierenden Gens auf DNA-Methylierung. Nukleäre DNA aus wachsenden (W), hungernden (K) und induzierten Plasmidien (I) wurde mit den Isoschizomeren Hpa II/Msp I und Mbo I/Sau 3AI geschnitten und die Fragmente wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung mit dem Plasmid 38 erfolgte wie im Experiment von Abb. 21 beschrieben. Man beachte die Banden bei 0.56 kb und 1.3 kb (Pfeile); Das ausschließliche oder verstärkte Auftreten dieser Banden in der DNA aus induzierten Plasmidien läßt eine teilweise Demethylierung des entsprechenden DNA-Fragments vermuten. Auf die durchgehende Bande von 4.5 kb wird im Text eingegangen.

induzierten Plasmodien andererseits, konnte auch für die Methylierung von Adenosin festgestellt werden (Abb. 22, die letzten 6 Bahnen). Dies war deutlich an einem 1.4 kb langen Fragment zu erkennen. Bei der Restriktion mit Mbo I trat diese Bande bevorzugt bei den induzierten Plasmodien auf, was als eine teilweise Demethylierung von Adenosinresten in diesem DNA-Stück als Folge der Lichtinduktion interpretiert werden kann. Bei der Restriktion mit Sau 3AI wurde dann etwa der Anteil der DNA, der in Wachstums- und Kontrollplasmodien durch die Methylierung von Adenosin für Mbo I nicht zugänglich war, fragmentiert (vergl. die 1.4 kb Fragmente von Mbo I: I und Sau 3AI: W,K). Die höhere Intensität dieser Bande bei den induzierten Plasmodien könnte schließlich auf die zusätzliche unspezifische Demethylierung von Cytosinresten, wie sie bei der Restriktion mit den Isoschizomeren Hpa II und Msp I beobachtet wurde, zurückgeführt werden. In diesem Fall würden sich die Effekte der A- bzw. C-Methylierung überlagern. Die Induktion von Protein 11 während der Sporulation wird also vermutlich von einer Demethylierung der Cytosin- als auch der Adenosinreste des zugehörigen Gens begleitet.

In einem Kontrollexperiment, bei dem ungeschnittene DNA mit dem Plasmid pBR 322 hybridisiert wurde, stellte sich heraus, daß in der nukleären DNA ein 4.5 kb großes extrachromosomales Element mit zumindest teilweisen Homologien zum pBR 322 enthalten ist (Abb. 23). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine lineare DNA, da keine zusätzlichen Banden auftraten, wie sie bei zirkulären als Supercoil vorliegenden Plasmiden infolge von Einzelstrangbrüchen und Aggregatbildung typisch sind. Die Abwesenheit von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Eco R I, Bam H I, Hind III, Hpa II, Msp I, Mbo I und Sau 3AI (siehe Abb. 20 und 21) könnte vermuten lassen, daß es sich hier gar nicht um eine DNA handelt, sondern z.B. um eine doppelsträngige RNA (ähnlich den Killerfaktoren in Hefe). Dies erscheint jedoch auf Grund der rigorosen RNase-Behandlung

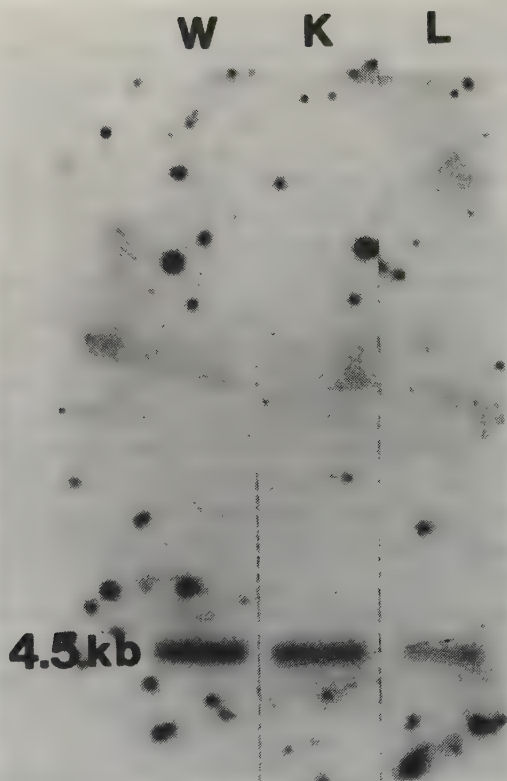


Abb. 23: Identifizierung eines extrachromosomalen Elements, das Homologien zum Plasmid pBR 322 aufweist. Nukleäre DNA aus Wachstums- (W), induzierten (I) und Kontrollplasmidien (K) wurde ungeschnitten in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und wie im Experiment von Abb. 21 beschrieben mit dem radioaktiv markierten Plasmid pBR 322 hybridisiert. Es wird in der DNA aus allen drei Stadien dieselbe Bande von 4.5 kb gefunden, wie sie bereits in den Hybridisierungen mit geschnittener DNA (Abb. 21 und 22) unabhängig von den verwendeten Enzymen nachgewiesen wurde.

der DNA-Präparationen (100µg/ml RNase A, 1 h bei 56°C) unwahrscheinlich. Da alle verwendeten Enzyme ihre spezifisch durch Methylierung modifizierten Schnittstellen nicht mehr erkennen können, liegt nahe, daß hier ein extrachromosomales DNA-Stück vorliegt, auf dem die Erkennungssequenzen für die oben angeführten Restriktionsenzyme, soweit vorhanden, durch eine hochgradige Methylierung der DNA maskiert sind.

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Licht auf die Genexpression in dem Myxomyceten *Physarum polycephalum* untersucht. Die Studien befaßten sich mit zwei lichtregulierten Differenzierungsprozessen (Sphärulation und Sporulation) und wurden mit Hilfe von in vivo Proteinmarkierung, in vitro Translation von isolierter RNA und rekombinanter DNA-Techniken durchgeführt.

Die Sphärulation

Die Differenzierung von hungernden Mikroplasmodien zu Sphärulen ist durch die Induktion zahlreicher neuer mRNA-Spezies gekennzeichnet, was durch in vitro Translation von isolierter RNA gezeigt werden konnte. Zugleich wird der Verlust von plasmodienspezifischen mRNAs beobachtet. Es wäre denkbar, daß das Licht die Sphärulation hemmt, indem es die Synthese von spezifischen Proteinen induziert, die die Translation der Sphärulen-mRNAs inhibieren. Da die RNA mit 4 M Guanidinium-rhodanid extrahiert wurde, dürfte jedoch ein solches regulatorisches Protein kaum in einer aktiven Form mitangereichert werden. Es kann daher angenommen werden, daß die An- oder Abwesenheit einer spezifisch während der Sphärulation translatierbaren mRNA die An- oder Abwesenheit des entsprechenden Moleküls reflektiert. Eine Transkriptionsregulation der Sphärulation wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß der RNA-Polymerase B Inhibitor α -Amanitin in ähnlicher Weise wie blaues Licht die Sphärulation inhibiert (Schreckenbach & Verfürth, 1982).

Einige der im Verlauf der Differenzierung induzierten mRNA-Spezies konnten näher charakterisiert werden. Von den 26 sphärulationsspezifischen in vitro Produkten waren

mindestens 8 identisch mit in vivo synthetisierten Proteinen. Bei zwei von diesen handelt es sich nach elektrophoretischen Kriterien (Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt) um Zellwandproteine. Dieses Ergebnis muß aber noch durch immunologische Studien erhärtet werden.

Blaues Licht inhibiert nicht nur die Proteinsynthese auf mRNA-Ebene, sondern ermöglicht gleichzeitig eine kontinuierliche Synthese jener Proteine, deren Produktion während der Sphärulation abgestellt wird. Das prominenteste Beispiel dafür ist das Aktin, welches von entscheidender Bedeutung für Struktur, Plasmaströmung und Bewegung der Plasmodien ist (Hatano et al., 1979).

Die Induktion der Sphärulen mRNAs erfolgt mit erheblicher Verzögerung. Am Ende einer 10-stündigen Hungerphase konnten erst 4 von insgesamt 26 differenzierungsspezifischen Spezies nachgewiesen werden. Wie bereits berichtet wurde (Schreckenbach & Verfürth, 1982), ist dieser Zeitraum durch eine maximale Photosensitivität der hungernden Mikroplasmodien charakterisiert. Nach dem Ablauf der ersten 10 h unter Hungerbedingungen nimmt die inhibierende Wirkung des Lichts kontinuierlich ab. Es scheint also eine frühe licht-sensitive Phase zu geben, während der kaum Veränderungen der Genexpression stattfinden, und die mit der erstmaligen Synthese sphärulenspezifischer mRNA-Spezies endet. Die über mehrere Stunden graduell abnehmende Lichtsensitivität erklärt sich aus der Asynchronität der Mikroplasmodienkultur, wie sie sich auch bei der Bildung reifer Sphärulen manifestiert.

Eine über längere Zeit (z.B. 30 h) aufrecht erhaltene Blaulichtbestrahlung hungernder Mikroplasmodien führt nicht zu einem neuen differenzierten Zustand, wie er etwa durch größere licht-induzierte Veränderungen der Protein- und mRNA-Synthese charakterisiert wäre. Statt dessen scheint das Plasmodienstadium aufrecht erhalten zu werden, das nach längerer Inkubation lediglich durch die Synthese einiger

hungerspezifischer Proteine gekennzeichnet ist. Die Funktion der 3 bzw. 2 licht-induzierten Protein- und mRNA-Spezies ist bis jetzt unklar.

Die Sporulation

Durch eine zwei- bis dreistündige Belichtungsphase wird in kompetenten *Physarum* Makroplasmodien die Sporulation induziert. Dieser irreversible Entwicklungsprozeß beinhaltet den Ablauf eines hochsynchronen zeitlichen Programms der Induktion und des Verlustes spezifischer mRNA-Spezies, das parallel zur Morphogenese etwa 10 h nach der Photoinduktion einsetzt. Dabei können induzierte Proteine und mRNA-Spezies gruppenweise genau definierten Stadien der Differenzierung zugeordnet werden. Im Gegensatz zur Photomorphogenese in Pflanzensystemen handelt es sich bei den licht-induzierten Proteinen in *Physarum* nicht um Bestandteile des Photosyntheseapparates oder Enzyme der Flavonoidbiosynthese (Lamb & Lawton, 1983). Vielmehr dürften einige dieser Proteine an strukturellen Funktionen im differenzierenden Plasmodium beteiligt sein.

Die beiden Tubuline T1 und T2 waren in sporulierenden Plasmodien während der Kulmination induziert oder zumindest in ihrer Synthese stark erhöht. Das gelegentliche Auftreten dieser Proteine in nicht induzierten Plasmodien ließ eine zellzyklusabhängige Synthese vermuten. Ihre Position in zweidimensionalen Gelen relativ zum Aktin weist auf eine Identität mit den Tubulinen α_1/α_1 , (T2-Duplett) und β_2/β_2 , (T1-Duplett) hin, die von Burland et al. (1983) in Wachstumsplasmodien charakterisiert wurden. Diese Autoren hatten gezeigt, daß die α_1 und β_2 Tubulinvarianten im Zellzyklus während der späten G₂-Phase kurz vor dem Erscheinen der Microtubuli im Mitose-Spindelapparat in verstärktem Maße synthetisiert werden. Daher könnte den Tubulinen neben einer strukturgebenden Funktion auch eine ähnliche Aufgabe bei der beschriebenen Präsporenmitose

zukommen (Sauer et al., 1969b). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, daß die maximale Konzentration an translatierbaren T1 und T2 mRNAs bei etwa 13 h der Entwicklung liegt, was mit dem Zeitpunkt der postulierten Präsporenmitose korreliert. Die T2 mRNA ist im Gegensatz zur T1 mRNA kontinuierlich bis zur Ausbildung der reifen Sporen nachweisbar, wenn auch in stark verminderter Intensität. Das deutet darauf hin, daß das T2 Tubulin nicht nur in Plasmodien, sondern auch in Amöben synthetisiert wird, wie dies für die α_1 -Spezies gezeigt wurde (Burland et al., 1983). Die Aufklärung der genauen Funktion von T1 und T2 während der Fruchtkörperbildung erfordert also noch weiterführende Experimente, in denen z.B. die Tubuline innerhalb der Zelle lokalisiert werden und in denen die Synthese ihrer mRNAs mit einer entsprechenden Hybridisierungsprobe gemessen wird.

Ein deutlicher Hinweis auf eine Neutranskription der induzierten Sporenproteine ergab sich bei der Fraktionierung der poly(A)-RNA nach Länge der poly(A)-Kette. Alle frisch induzierten mRNA-Spezies wiesen einen signifikant höheren poly-Adenylierungsgrad auf (100-130 Nukleotide), im Vergleich zu den nicht oder bereits seit längerem induzierten Spezies. In verschiedenen Mammalia-Systemen ist bereits gezeigt worden, daß die posttranskriptional hinzugefügte poly(A)-Sequenz anfänglich in ihrer ursprünglichen Länge auch im funktionellen cytoplasmatischen mRNA-Molekül wiedergefunden wird, aber dann innerhalb von wenigen Stunden auf etwa 50-60 Nukleotide gekürzt wird (Sheiness & Darnell, 1973). Es liegt daher nahe, daß die während der Sporulation induzierten mRNA-Spezies neu transkribiert werden. Als Alternative dazu müßte eine Speicherung von mRNA-Vorläufermolekülen im Zellkern postuliert werden, wobei die Regulation dann auf der Ebene des Processing erfolgen würde.

Eine direkte Untersuchung induzierter mRNA-Moleküle

machte die Isolierung eines sporulationsspezifischen cDNA-Clons notwendig. Dabei ergaben sich gewisse Schwierigkeiten, was die Selektion spezifischer Clone und das Herausschneiden der cDNA-Inserts betraf. Die Kolonien wurden mit endmarkierter poly(A)-RNA aus induzierten und Kontrollplasmodien hybridisiert. Es stellte sich heraus, daß der Zeitpunkt zu dem die RNA isoliert wurde, von ausschlaggebender Bedeutung für die Selektion der Clone war. Die in vitro Translationsexperimente zeigten, daß die induzierten sporulationsspezifischen mRNA-Spezies relativ rasch ihre Konzentrationsmaxima durchlaufen. Da die Aufarbeitung der Plasmodien sich etwa über 1 h erstreckte, sind die manchmal unterschiedlichen Ergebnisse der Koloniehybridisierungen höchstwahrscheinlich auf Schwankungen spezifischer mRNA-Populationen zurück zu führen.

Aus nicht geklärten Gründen enthielten alle analysierten Plasmide eine 700 bp Deletion zwischen der Pst I- und der Eco R I-Schnittstelle (inklusive). Die cDNA-Insertionen wurden daher mit Pst I und Hind III herausgeschnitten. Als mögliche Erklärung für diese Deletion kommt eine Verunreinigung von Pst I mit Eco R I in Frage, zumal die in allen Plasmiden vorhandene gleichgroße Deletion kaum auf natürlichem Wege entstanden sein kann. Es wurde schließlich ein nur mit poly(A)-RNA aus induzierten Plasmodien hybridisierender Clon ausgewählt, der ein 250 bp Insert enthielt und sich in den anschließenden Experimenten als eine sporulationsspezifische Hybridisierungsprobe erwies. Die mit der isolierten cDNA durch Hybridisierung selektionierte mRNA codierte bei der in vitro Translation für das Sporenprotein 11, dessen Synthese ausschließlich während der Morphogenesephase beobachtet wurde. Die Identifizierung des Translationsproduktes war eindeutig, da bei den Kontrollplasmodien an der für dieses Protein in einem zweidimensionalen Gel charakteristischen Position keine oder nur sehr schwach markierte Proteine lagen.

In dem "Northern blot" Experiment konnte gezeigt werden, daß die stimulierte in vivo Synthese des Sporenproteins 11 und die induzierte mRNA-Translationsaktivität in vitro auf eine etwa 20-fach höhere Konzentration des 1.6 kb langen mRNA-Moleküls im Vergleich zu den Kontrollplasmodien zurück zu führen ist. Da die hohe Konzentration an reifer mRNA in induzierten Plasmodien nicht plausibel durch Processing von in sporulationskompetenten Plasmodien angehäuften Vorläufermolekülen erklärt werden kann, handelt es sich in diesem Fall aller Voraussicht nach um eine Neutranskription des zugehörigen Gens (siehe auch Diskussion an entsprechender Stelle im Ergebnisteil). Um die Frage nach einer Transkriptionskontrolle endgültig klären zu können, bedarf es jedoch weiterer Experimente. Diese könnten z.B. "Northern blot" Hybridisierungen mit Gesamt-RNA beinhalten, wobei die spezifische Radioaktivität der Hybridisierungsprobe so hoch wie möglich sein sollte. Die in dieser Arbeit eingesetzte spezifische Aktivität von $5\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Plasmid reichte nicht aus, um eine eindeutige Hybridisierung mit Gesamt-RNA nachweisen zu können. Außerdem müßte es möglich sein, die mRNA mit Hg-CTP in vivo zu markieren, wenn man die bei *Physarum* bereits etablierte Methode der Mikroinjektion benützt, um die radioaktiven Nukleotidtriphosphate in ausreichender Menge in die Zelle zu bringen. Die neu transkribierten RNA-Moleküle können dann an immobilisierte Sulfhydrylgruppen gebunden und selektiv angereichert und analysiert werden (Dale et al., 1974).

Eine Untersuchung der chromosomalen Organisation des für das sporulationsspezifische Protein 11 kodierenden Gens erbrachte einige interessante Ergebnisse. Hybridisiert man das Plasmid 38, das ein für das Protein 11 codierendes cDNA-Insert trägt, in einem "Southern blot" Experiment mit Hind III bzw. Bam H I fragmentierter DNA, so findet man deutliche Unterschiede in der Größe der hybridisierenden Fragmente zwischen hungernden und Wachstumsplasmodien. Bei der Restriktion mit Eco R I hingegen waren die entsprechen-

den Fragmente in allen Fällen gleich groß. Dieses Ergebnis kann in zweifacher Weise interpretiert werden. Da die Hind III- und Bam H I-Fragmente der DNA aus Wachstumsplasmodien jeweils ein im Vergleich zu den hungernden Plasmodien höheres Molekulargewicht aufwiesen, liegt es nahe, daß einige Restriktionsschnittstellen spezifisch methyliert und daher von den Enzymen nicht erkannt werden. Hind III wird durch Methylierung am Adenin, Bam H I durch Methylierung am Cytidin gehemmt. Denkbar wäre auch, daß hier die Umlagerung eines Gens in eine andere Umgebung des Chromosoms vorliegt, wobei das Gen gleichzeitig von einem passiven in einen potentiell aktiven Zustand übergeht. Fest steht, daß eine Modifizierung bzw. Umlagerung dieses Gens bereits beim Übergang von der Wachstums- in die Hungerphase stattfindet, und nicht erst als Folge der Lichtinduktion sporulationskompetenter Plasmodien.

Bei einem analogen Experiment mit den isoschizomeren Enzymen Hpa II/Msp I bzw. Mbo I/Sau 3AI konnten jedoch Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen Wachstums- und hungernden, nicht induzierten Plasmodien einerseits, und induzierten Plasmodien andererseits nachgewiesen werden (im Ergebnisteil an entsprechender Stelle diskutiert). In diesem Fall wurde eine Demethylierung des Gens bzw. seiner unmittelbaren Umgebung als Folge der Lichtinduktion gefunden. Dieser Befund steht im Einklang mit der gängigen Hypothese, daß "aktive" Gene einen niedrigen Methylierungsgrad aufweisen, wobei der umgekehrte Schluß nicht immer zutrifft (Kuo et al., 1979).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß dieses Gen, welches für ein prominentes sporulationsspezifisches Protein codiert, bereits beim Übergang in die Hungerphase demethyliert oder umgelagert wird. Nach Induktion der Sporulation erfolgt eine (zusätzliche ?) Demethylierung dieses DNA-Abschnitts, womit das Gen wahrscheinlich in seiner transkriptionsaktiven Form vorliegt.

Im Rahmen eines Kontrollexperimentes wurde das pBR 322

Wildtypplasmid mit unfragmentierter chromosomaler DNA hybridisiert. Dabei stellte sich heraus, daß in der nukleären DNA ein 4.5 kb langes extrachromosomales Element enthalten ist (Abb. 23). Dieses konnte sowohl im haploiden CL-Stamm als auch in der weißen Mutante des diploiden Stammes LU (897 X 898) nachgewiesen werden. Es muß zumindest teilweise starke Homologien zum pBR 322 Plasmid aufweisen, zumal nach der Hybridisierung unter stringenten Bedingungen gewaschen wurde (40 mM Salz, 2x 30 min bei 65°C). Folgende Fakten sprechen dafür, daß es sich dabei um ein lineares, hochgradig methyliertes DNA-Molekül handelt:

Alle DNA-Präparationen wurden 1 h bei 56°C mit 100 µg/ml RNase A behandelt. Obwohl doppelsträngige RNA-Strukturen, wie sie in ähnlicher Größe z.B. als Killerfaktoren in *Saccharomyces cerevisiae* vorkommen (Wickner, 1978), einigermaßen resistent gegen Ribonukleasen sind, ist es unwahrscheinlich, daß bei dieser rigorosen RNase-Behandlung derartige Moleküle völlig intakt bleiben. Aus der Abwesenheit von Schnittstellen für 7 verschiedene Restriktionsenzyme, darunter auch von Isoschizomeren wie Hpa II und Msp I muß daher auf einen hohen Methylierungsgrad der DNA geschlossen werden.

Denkbar wäre auch, daß es sich bei diesem Element um ein Plasmid aus kontaminierenden Bakterien handelt, zumal *Physarum* Amöben normalerweise auf einem Bakterienrasen gezüchtet werden. Diese Möglichkeit kann aber aus folgenden Gründen praktisch ausgeschlossen werden: Makroplasmodien werden durch Fusion von Mikroplasmodien hergestellt. Diese müssen vorher in Schüttelkultur 3 Tage hochgezogen werden. Jede bakterielle Kontamination würde sich über einen so langen Zeitraum sichtbar manifestieren. Außerdem ist die Reinheit der Kernpräparationen, aus denen ja die DNA isoliert wurde, nach jeder Aufarbeitung unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft worden. Bei der verwendeten Vergrößerung (1000x) hätte man eine Kontamination durch Bakterien einwandfrei feststellen können. Dies war nicht der Fall.

Nach jetzigem Wissensstand ist daher zu vermuten, daß es sich hier um ein extrachromosomales, hochmethyliertes DNA-Molekül handelt, das in linearer Form vorliegt und in seiner Größe und Art am ehesten den in *Kluyveromyces lactis* gefundenen virusähnlichen Killerfaktoren vergleichbar ist (Gunge et al., 1981).

Photomorphogenese in *Physarum*. Ein Vergleich mit anderen nicht photosynthetischen Modellorganismen

Für eine Untersuchung blaulicht-regulierter Entwicklungsprozesse sind Pilze und Schleimpilze in besonderer Weise geeignet. Es gibt in diesen Organismen mehrere Differenzierungsreaktionen, die durch den ubiquitären Blaulichtrezeptor ("Cryptochrom") gehemmt oder induziert werden. Diese können nach heutigem Wissen unbeeinflusst von Photosynthese und Phytochromwirkung analysiert werden.

Trotzdem gibt es bislang nur zwei Systeme, bei denen der Einfluß von Blaulicht auf die Entwicklung einigermaßen detailliert untersucht wurde, nämlich bei *Phycomyces* und *Trichoderma viride*. In beiden Fällen wird u.a. die Sporulation durch Licht induziert. Bei *Phycomyces* ist diese Photomorphogenese zwar biologisch gut charakterisiert, aber es gibt keine Berichte über einen Zusammenhang zwischen Induktion und Nukleinsäure-Metabolismus (Gressel, 1980). Besser untersucht ist hingegen die lichtinduzierte Fruchtkörperbildung in *Trichoderma viride*. Dieser Prozeß ist extrem lichtsensitiv, es genügt ein dreiminütiger Lichtpuls für die Induktion und nach etwa 30 h ist die Ausbildung der reifen Sporen abgeschlossen. Es wurden an diesem System Inhibitorstudien mit 5-Fluoruracil und 8-Azaguanin durchgeführt, die vermuten ließen, daß die Sporulation durch eine Hemmung der Transkription inhibiert werden kann (Betina & Zajacova, 1978). Solche Studien sind aber mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, zumal die Nebenwirkungen der verwendeten Substanzen kaum bekannt sind. Mit Hilfe von

DNA/RNA-Hybridisierungsexperimenten konnten keine Unterschiede in den Konzentrationen verschiedener mRNA-Spezies nachgewiesen werden (Stavy et al., 1972). Es gibt jedoch etwa 40 nichtsporulierende Mutanten, die sonst normal wachsen. Dies deutet darauf hin, daß spezifische Gene für die Sporulation benötigt werden. Ein direkter Nachweis induzierter Proteine und mRNA-Spezies steht aber noch aus.

Die beiden in dieser Arbeit charakterisierten lichtregulierten Differenzierungsreaktionen des azellulären Schleimpilzes *Physarum polycephalum* haben sich als geeignete Modellsysteme zum Studium blaulicht-regulierter Genexpression erwiesen. Es stehen entwicklungsspezifische cDNA-Clone zur Verfügung, die es ermöglichen, die entsprechenden Gene zu isolieren und detaillierte Transkriptionsstudien durchzuführen.

Bis jetzt ist die in dieser Arbeit charakterisierte mRNA des prominenten Sporenproteins 11 der früheste molekulare Marker für die Fruchtkörperbildung in *Physarum*, der einer molekularbiologischen Analyse zugänglich ist. Die Verzögerung zwischen der Lichtinduktion und einer signifikanten Veränderung der mRNA-Konzentration beträgt etwa 10 h. Dieser Zeitraum ist vergleichbar mit dem bei der UV-Induktion von Enzymen für die Flavonoidsynthese in der Petersilie (Kreuzaler et al., 1983). Es muß angenommen werden, daß während dieser Phase das Lichtsignal in ein chemisches Signal umgewandelt wird, das dann über eine bislang unbekannte Reaktionskette die Transkription beeinflusst. Die Aufklärung dieser Signalübertragung ist eines der wesentlichen ungelösten Probleme bei der Photomorphogenese. Das *Physarum* System könnte zur Lösung dieses Problems beitragen, da die Makroplasmodien ein homogenes biologisches Material darstellen, das besonders gut für Zellfusions- und Mikroinjektionsexperimente geeignet ist, wie sie für die Identifizierung licht-induzierter chemischer Signale notwendig sind.

V. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg, BRD
Agar	Difco, Detroit, Mich., USA
Agarose	Seakem, Marine Colloids Div. FMC Corp., Rockland, ME., USA
Amidoschwarz	Sigma, München, BRD
Ampholine	LKB, Bromma, Schweden
Antifoam A	Sigma, München, BRD
Bacto-tryptone	Difco, Detroit, Mich., USA
Bentonit	Sigma, München, BRD
DNA des Phagen Φ X-174	P-L Biochemicals, St. Goar, BRD
DNA-Längenstandard	Boehringer-Mannheim, BRD
Ficoll Typ 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Guanidiniumrhodanit	Fluka, Neu-Ulm, BRD
Halobakterien DNA	Geschenk von Frau Jutta Straub
Hefeextrakt	Difco, Detroit, Mich., USA
Heringsperma DNA	Serva, Heidelberg, BRD
N,N-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg, BRD
Orange G	Sigma, München, BRD
Percoll	Pharmacia, Uppsala, Schweden
poly-U-Sepharose 4B	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Radiochemikalien	Amersham-Buchler, Braunschweig; New England Nuclear, Dreieich, BRD
Retikulozytenlysat	Amersham-Buchler, Braunschweig; New England Nuclear, Dreieich, BRD
Ribonukleaseinhibitor	BRL, Neu-Isenburg, BRD

(RNAsin)

Rinderserumalbumin	Sigma, München, BRD
Surfynol	Serva, Heidelberg, BRD
Xylencyanblau	Sigma, München, BRD

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Sigma und Serva bezogen.

1.2 Enzyme

E. coli DNA-Polymerase I (für Nick-Translation)	Boehringer Mannheim, BRD
Polynukleotidkinase	P-L Biochemicals, St.Goar, BRD
Proteinase K	Boehringer-Mannheim, BRD
Restriktionsenzyme	Boehringer-Mannheim, BRD
	BRL, Neu-Isenburg, BRD
AMV Reverse Transkriptase	J. Beard, Life Sciences, Fl., USA
Terminale Desoxynucleotidyl- transferase	P-L Biochemicals, St.Goar, BRD

1.3 Sonstige Materialien

Celluloseacetat CA-250/0	Schleicher & Schüll, Dassel, BRD
3 MM Chromatographie- papier	Whatman, England
Nitrocellulose, 0.45µm	Schleicher & Schüll, Dassel, BRD
Porengröße	
Röntgenfilm X-ray 90	Linhardt, München, BRD

1.4 Allgemein verwendete Reagenzien und Puffer

TE-Puffer: 1 mM EDTA

10 mM Tris/HCl pH 8.0

Phenol: für alle Extraktionen wurde, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, TE-Puffer-gesättigtes Phenol mit 0.1 % 8-Hydroxychinolin verwendet.

CHCl_3 : CHCl_3 /Isoamylalkohol 24+1

20x SSC: 3 M NaCl

0.3 M Trinatrium-Citrat pH 7.0

20x SSPE: 3.6 M NaCl

20 mM EDTA

200 mM NaH_2PO_4 pH 7.4

1.5 Stämme der verwendeten Organismen

E. coli RR 1: ein recA^+ Abkömmling von *E. coli* HB 101

Genotyp: F^- , hdsS20 (r_B^- , m_B^-),

ara-14 , proA2 , lacY1 , galK2 , rpsL20 (Sm^r),

xyl-5 , mtl-1 , supE44 , λ^-

Physarum polycephalum [LU897 x LU898]: Es wurde eine weiße Mutante dieses diploiden Stammes verwendet.
(Anderson, 1977)

Physarum polycephalum CL: Ein gelber, haploider Stamm
(Colonia Leicester; Cooke & Dee, 1975)

2. Kulturbedingungen

2.1 Medien für *Physarum*

(1) Wachstumsmedium:

Bacto-tryptone, 10 g, Hefeextrakt, 1.5 g, Glucose, 10 g, Salzlösung, 120 ml; pH 4.6 (mit KOH), +H₂O ad 1000 ml.

Salzlösung:

Citronensäure·1H₂O (16.85 g), FeCl₂·4H₂O (0.25 g), MgSO₄·7H₂O (2.5 g), MnCl₂·4H₂O (0.35 g), ZnSO₄·7H₂O (0.14 g), CaCl₂·2H₂O (2.5 g, getrennt lösen, als letztes zugeben); ad 500 ml.

(2) Sphärulationsmedium:

30 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 20 mM Trinatrium-Citrat, pH 4.7

(3) Sporulationsmedium:

Wie Wachstumsmedium, aber ohne Bacto-tryptone, Hefeextrakt und Glukose.

2.2 Medien für *E. coli*

Agarplatten: 10 g NaCl

10 g Bacto-tryptone

5 g Hefeextrakt

10 g Agar

ad 1 l

Wachstumsmedium: wie unter Agarplatten, aber ohne Agar

Antibiotica: Tetracyclin (15 mg/l)

Ampicillin (100 mg/l)

2.3 Züchtung von Mikroplasmodien, Induktion der Sphärulation und Belichtung der Plasmodien

Die diploide weiße *Physarum polycephalum* Mutante LU897 X LU898 wurde in Schüttelkultur auf halbdefiniertem Medium (Wachstumsmedium) gezüchtet (Daniel & Baldwin, 1964). Die Mikroplasmodien wurden in folgender Weise für die Sphärulation vorbereitet: 50 Stunden alte Schüttelkulturen (50 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben) wurden mit weiteren 50 ml Wachstumsmedium versetzt und für 20 Stunden weitergeschüttelt. Die Plasmodien wurden abzentrifugiert (2 min, 300 g), dreimal mit Sphärulationsmedium gewaschen und in einer Konzentration von $26 \text{ mm}^3/\text{ml}$ resuspendiert (Standardsuspension). Die Bestimmung des Zellvolumens erfolgte durch Zentrifugation (3 min, 600 g) in Sphärulationsmedium (mit zusätzlich 200 mM KCl) in kalibrierten Zentrifugengläsern. Die Inkubationen wurden im Dunkeln in thermostatisierten, zylindrischen Gefäßen mit einem Fassungsvermögen von 3 ml bzw. 50 ml bei 24°C auf einem Orbitalschüttler (Kühner, Basel) durchgeführt (250 rpm). Die Belichtung der Proben erfolgte mit Hilfe von 250 W-Diaprojektoren (Noris), im Falle von Blaulicht unter Verwendung eines FSK 7 Filters (Schott, $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, Halbwertsbreite = 50 nm) mit einer Intensität von $250 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, für Rotlicht mit einem OG 570 Filter ($\lambda > 570 \text{ nm}$) bei einer Intensität von $5 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Die Intensität der Blaulichtbestrahlung entsprach der niedrigst möglichen Dosis, um eine permanente Inhibition der Sphärulation zu gewährleisten (Schreckenbach et al., 1981). Alle Manipulationen wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Der Grad der Sphärulation wurde durch Auszählen

der Plasmodien und Sphärulen unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

2.4 Makroplasmodien, Induktion der Sporulation

Mikroplasmodien des farblosen Stammes LU897 X LU898 wurden wie oben beschrieben angezogen. Zur Züchtung von Makroplasmodien wurden die Mikroplasmodien abzentrifugiert und einmal mit Sporulationsmedium gewaschen (Daniel & Rusch, 1962). Das Plasmodienpellet wurde mit 1 Volumen Wachstumsmedium verdünnt und jeweils 1 ml dieser Suspension wurde in Petrischalen auf ein Filterpapier von 8 cm Durchmesser (Schleicher und Schüll, Nr. 595), unterlegt mit einem zweiten Filter (2319/8), aufgetropft. Nach Zugabe von 4 ml Wachstumsmedium wurden die Plasmodien inkubiert bis sie einen Durchmesser von 8 cm erreicht hatten (etwa 40 h bei 22°C). Sie wurden anschließend in eine andere Petrischale, beschickt mit 10 ml Sporulationsmedium, auf ein rostfreies Stahlnetz transferiert. Die Induktion für die Sporulation wurde am 4. Hungertag durchgeführt und erfolgte durch eine 3-stündige Belichtung mit weißem Neonlicht (Osram L40W/25-1, 2 W/m², 22°C).

3. In vivo Markierung, Extraktion und Identifizierung von Plasmodienproteinen

3.1 Mikroplasmodien

3 ml einer Standardsuspension wurden mit 10 µCi/ml L-[³⁵S]Methionin (1000-1200 Ci/mMol) in vivo markiert. Die Inkubation wurde durch Einfrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff gestoppt. Nach dem Auftauen wurden die

Proteine durch Zugabe von 1/10 Volumen 6 N HClO_4 bei 0°C gefällt, zweimal mit 2 mg/ml L-Methionin in 0,06 N HClO_4 und einmal mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum wurde der Niederschlag durch Beschallung in Elektrofokussierungspuffer (9 M Harnstoff, 2 % Nonidet P-40, 5 % β -Mercaptoethanol, O'Farrell, 1975) gelöst. Die in die Proteine eingebaute Radioaktivität wurde durch einen Filtertest und Flüssigszintillationszählung in Rotiscint 22 (Roth, Karlsruhe) bestimmt.

3.2 Makroplasmodien

Für die radioaktive Markierung von in vivo synthetisierten Proteinen wurden die Makroplasmodien auf 6 zusätzlichen Filtern von 3 cm Durchmesser (Schleicher und Schüll, Nr. 595) gezüchtet. Einer dieser Filter, auf dem sich ein repräsentativer Teil des Plasmodiums befand, wurde entfernt und in einer anderen Petrischale mit 0,5 ml Sporulationsmedium und 120 μCi L-[^{35}S]Methionin (1000-1200 Ci/mMol) inkubiert. Anschließend wurde das Plasmodium vom Filter gekratzt und in 300 μl 40 mM Tris/HCl, pH 7.4, 5 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 30 % Sucrose homogenisiert. Nach Zentrifugation (10000 g, 10 min) wurde der Überstand mit DNase und RNase (50 $\mu\text{g/ml}$, 10 min, 56°C) behandelt und gelelektrophoretisch analysiert.

3.3 Identifizierung von Tubulinen

Die Identifizierung der Tubuline erfolgte durch Copräzipitation mit Schweinehirntubulin (Dentler et al., 1975). Dazu wurde ein Makroplasmodium während der Kulminationsphase (12-13 h nach Induktion) in vivo markiert, vom Filter gekratzt und in 500 μl PMG-Puffer (8 M Glycerin, 1 mM GTP, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , 100 mM Pipes, pH 6.9) bei 0°C homogenisiert. Nach Zentrifugation (10000 g, 10 min,

4°C) wurde der Überstand (150 µl) geteilt. 50 µl wurden mit 10 Volumen 80% Aceton gefällt (Niederschlag enthält die induzierten Tubuline), die restlichen 100 µl mit 1 Vol. einer Lösung von Schweinehirntubulin (5-6 mg/ml) in PM-Puffer (= PMG-Puffer ohne Glycerin) verdünnt. Die Selbstaggregation der Tubuline wurde durch eine 30-minütige Inkubation bei 37°C induziert. Die aggregierten Tubuline wurden in einer Airfuge (Beckman) abzentrifugiert (135000 g, 50 min, 25°C) und der Überstand, der die übrigen Plasmodienproteine enthielt, mit Aceton gefällt. Die Tubulinaggregate wurden schließlich einem zweiten Dissoziations-/Aggregationszyklus unterworfen. Alle Proben wurden in Elektrofokussierungspuffer (9 M Harnstoff, 2 % Nonidet P-40, 5 % β -Mercaptoethanol) gelöst und nach Bestimmung der in den Proteinen enthaltenen Radioaktivität mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert.

Isolierung von Schweinehirntubulin

Für die Anreicherung wurde frisches Schweinehirn verwendet, das nach der Methode von Dentler (1975) präpariert wurde. Dazu wurden 350 g Schweinehirn in 300 ml PM-Puffer bei 0°C in einem Braun Mixer 1 min homogenisiert, mit 5 Stößen bei 2000 rpm gepottert und 1 h bei 4°C und 130000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit PMG-Puffer verdünnt und unter leichtem Rühren 30 min bei 37°C inkubiert. Die aggregierten Tubuline wurden abzentrifugiert (1 h, 25°C, 130000 g), der Niederschlag bei 0°C in 100 ml PM-Puffer resuspendiert, gepottert und 30 min in Eis gestellt. Die nicht gelösten Tubuline wurden erneut pelletiert (30 min, 4°C, 130000 g), der Überstand mit 1 Vol. PMG-Puffer (0°C) verdünnt und über Nacht bei -70°C aufbewahrt. Die Lösung wurde wieder 30 min bei 37°C inkubiert und die aggregierten Tubuline abzentrifugiert (1 h, 25°C, 130000 g). Der Tubulinniederschlag wurde schließlich einem dritten Dissoziations-/Assoziationszyklus unterworfen und für das Experiment verwendet. Die Tubulinpräparationen wurden in

PM-Puffer bei -70°C gelagert.

4. Isolierung und Charakterisierung von Zellwandproteinen aus Sphärulen

Sphärulenzellwände wurden nach einer Methode von McCormick (1970) mit einigen Modifikationen isoliert. Die Sphärulen wurden dreimal mit Wasser gewaschen und in einer French Press bei 8000 Psi aufgeschlossen. Die Fragmente wurden nochmals mit Wasser gewaschen und anschließend für 15 h in 1 M NaCl bei 50°C gerührt. Die Zellwandfragmente wurden dann abzentrifugiert (15 min, 15000 g), mit H_2O gewaschen und für fünf Stunden in 0,1 % SDS gerührt. Nach erneutem Waschen mit H_2O wurden die gereinigten Sphärulenzellwände im Vakuum getrocknet und anschließend mit 67%iger Essigsäure unter Beschallung für 30 min extrahiert. Der Proteinextrakt wurde für 2 h gegen $\text{H}_2\text{O}/0,5\%$ β -Mercaptoethanol und für 15 h gegen 0,1 M Na-Acetat, 0,5 % β -Mercaptoethanol dialysiert. Die Proteine wurden schließlich mit 3 Volumen Aceton gefällt, in Elektrofokussierungspuffer gelöst und auf zweidimensionalen Gelen analysiert.

5. Messung der in vivo RNA-Synthese

Die Synthese von RNA in der intakten Zelle wurde durch Markierung mit $[^3\text{H}]$ Uridin gemessen. Für die Langzeitmarkierung wurden jeweils 3,5 ml (Kontrolle und belichtete Probe) einer Standardsuspension von Mikroplasmodien mit $2,5\ \mu\text{Ci/ml}$ $[5,6\text{-}^3\text{H}]$ Uridin (New England Nuclear, 50 Ci/mMol) versetzt, in etwa 60-minütigen Intervallen Aliquots ($2 \times 100\ \mu\text{l}$) entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Pulsmarkierungsexperimente wurden

jeweils 50 ml Standardsuspension im Dunkeln bzw. unter Blaulichtbestrahlung inkubiert, in bestimmten Abständen je 3 ml entnommen, mit 5 $\mu\text{Ci/ml}$ [5,6- ^3H]Uridin 40 min pulsmarkiert, und davon jeweils 2 x 200 μl Aliquots eingefroren. Zur Auswertung der Proben wurden die gefrorenen Aliquots mit 800 μl Triton-Puffer (0.15 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 min mit Diethylpyrocarbonat gerührt und autoklaviert) verdünnt und 20 min bei 56°C inkubiert. Die Proben wurden geteilt und eine Hälfte ohne und die andere mit Ribonuklease behandelt (100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A, 4 $\mu\text{g/ml}$ RNase T₁, 60 min, 56°C). Alle Proben wurden schließlich mit Pronase verdaut (1 mg/ml, 45 min, 56°C), nach Zugabe von 100 μl Carriermix (0.5 g Heringsperma-DNA, 100 mg Uridin, 50 mM EDTA, pH 7.5, ad 100 ml) mit 2 ml 20%iger Trichloressigsäure gefällt und die in säurefällbares und RNase-labiles Material inkorporierte Radioaktivität bestimmt.

6. Isolierung und in vitro Translation von mRNA

Gesamt-RNA aus Mikro- bzw. Makroplasmodien wurde je nach Verwendungszweck nach der Guanidiniumrhodanid- oder Phenolmethode isoliert (Chirgwin et al., 1979; Melera et al., 1978; Werenskiöld, 1982).

6.1 Guanidiniumrhodanid-Extraktion von RNA

Puffer A: 50,0 g Guanidinium-SCN

0,5 g Na-Laurylsarkosinat

2,5 ml 1 M Trinatrium-Citrat, pH 7

0,7 ml β -Mercaptoethanol

0.3 ml Antifoam A

Puffer B: 71,6 g Guanidinium-HCl
 2,5 ml 1 M Trisnatrium-Citrat, pH 7
 5 mM DTT

Beide Puffer wurden filtriert, mit NaOH
 auf pH 7.0 eingestellt und mit H₂O auf
 100 ml aufgefüllt.

Im Fall von Mikroplasmodien wurde der Zellsniederschlag aus 5 ml Standard-suspension in 1,6 ml Puffer aufgenommen und lysiert. Sphärulen wurden im selben Volumen Puffer A suspendiert und anschließend in einer French Press bei 8000 Psi aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (10 min, 10000 g) und der Überstand durch Zugabe von 0,1 Vol. 10 M LiCl und 0,75 Vol. Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Makroplasmodien wurden auf 6 zusätzlichen Filtern von 3 cm Durchmesser (Schleicher und Schüll, Nr. 595) gezüchtet. Die einzelnen Filter, auf denen sich Teile des Plasmodiums befanden, wurden nacheinander in 3 ml Puffer A getaucht und geschüttelt. Nach Lyse der Plasmodien wurden die Filter entfernt, die Lösung zentrifugiert (10 min, 10000 g), der Überstand mit 0,1 Vol. 10 M LiCl und 0,75 Vol. Ethanol versetzt und bei -20°C über Nacht aufbewahrt. Das präzipitierte Material wurde abzentrifugiert (10 min, -10°C, 8000 g), in 0,8 ml Puffer B gelöst, und durch Zugabe von 0,1 Vol. 10 M LiCl, 0,5 Vol Ethanol erneut gefällt (2-3 h, -20°C). Die Nukleinsäuren wurden wieder abzentrifugiert, in 0,5 ml Puffer B gelöst und mit 0,1 Vol. 10 M LiCl und 0,5 Vol. Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und 3x mit je 100 µl H₂O extrahiert. Von den vereinigten wässrigen Lösungen wurde ein UV-Spektrum aufgenommen (320 nm - 220 nm) und die RNA-Konzentration anhand der Extinktion bei 260 nm bestimmt ($E_{260} = 1$ entspricht 40 µg RNA/ml). Die RNA wurde mit 0,1 Vol. 10 M LiCl und 3 Vol. Ethanol bei -20°C gefällt und bei Bedarf im entsprechenden Volumen H₂O gelöst.

6.2 RNA-Anreicherung nach der Phenolmethode (Melera et al., 1978)

Puffer A: 0.1 M Na-Acetat, 1 mM EDTA, 2 % SDS,
1 % Bentonit, pH 6.0

Puffer B: 0.1 M Tris-Succinat, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA,
2 % SDS, 1 % Bentonit, pH 8.5

Puffer C: 0.1 M Tris-Succinat, 0.7 M NaCl, 1 mM EDTA,
2 % SDS, 1 % Bentonit, pH 8.5

Phenolreagens: Phenol, gesättigt mit Puffer A,
10 % m-Cresol, 0.1 % 8-Hydroxychinolin

Bentonitsuspension (Fränkel-Conrat & Singer, 1961):

2 g Bentonit wurden in 40 ml H₂O suspendiert, abzentrifugiert (15 min, 2000 g) und der Überstand erneut zentrifugiert (20 min, 7000 g). Das Sediment wurde in 20 ml 0,1 M EDTA pH 7,0 resuspendiert und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde erneut zentrifugiert wie oben angegeben, das Sediment der zweiten Rezentrifugation in 0,01 M Essigsäure pH 6,0 resuspendiert und abermals zentrifugiert (20 min, 7000 g). Schließlich wurde eine 4%ige Bentonitlösung (bezogen auf das Naßgewicht) in 0,01 M Essigsäure hergestellt.

Die Aufarbeitung von Mikro- und Makroplasmoiden unterschied sich lediglich beim Aufschluß der Zellen.

Mikroplasmoiden:

Der Zellniederschlag aus 10 ml Standardsuspension wurde bei 0°C mit 4 ml Puffer A versetzt und unter Schütteln lysiert. Die wässrige Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol 10 min im Eisbad extrahiert und die Phasen anschließend durch Zentrifugation getrennt (5 min, 4°C, 5000 g). Die Oberphase wurde abgenommen, in Eis aufbewahrt, und die Phenol- und

Interphase wurden je einmal mit 1 Vol. Puffer B für 20 min bei 20°C und mit 1 Vol. Puffer C bei 45°C für 20 min reextrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden einmal mit 1 Vol. Phenol/ CHCl_3 (1:1) und einmal mit Chloroform ausgeschüttelt und anschließend durch Zugabe von 0.1 Vol. 10 M LiCl und 2 Vol. Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert (20 min, 4°C, 8000 g), einmal mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in H_2O gelöst.

Makroplasmodien:

Eine Mischung aus 1 Vol. Puffer A und 1 Vol. Phenol wurde auf 60°C erwärmt und die Makroplasmodien samt Filter darin unter Schütteln lysiert (etwa 25 Plasmodien in 80 ml). Die Filter wurden entfernt und die Extraktion in analoger Weise wie bei den Mikroplasmodien fortgesetzt.

6.3 Anreicherung von poly(A)-RNA durch Affinitätschromatographie

Es wurde nach der Phenolmethode gewonnene Gesamt-RNA verwendet und die poly(A)-RNA durch Bindung an poly-U-Sepharose angereichert (Palatnik et al., 1979).

CSB-Puffer: 25 % Formamid, 0.7 M NaCl, 10 mM EDTA,
50 mM Tris/HCl pH 7.5

LS-Puffer: 25 % Formamid, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA,
50 mM Tris/HCl pH 7.5

EB-Puffer: 90 % Formamid, 10 mM EDTA, 0.2 % SDS,
50 mM HEPES pH 7.0

3-5 mg Gesamt-RNA wurden in 4 ml Probenpuffer (1 % SDS, 30 mM EDTA pH 8) gelöst, 3 Minuten auf 60°C erhitzt und in einem Trockeneis/Ethanol Bad abgekühlt. Die Probe wurde auf 25°C erwärmt, mit 4 Vol. CSB-Puffer verdünnt und auf eine

thermostatisierte poly-U-Sepharose Säule (1 g, equilibriert mit CSB-Puffer, 25°C) zweimal hintereinander aufgetragen (1 ml/min). Die Säule wurde mit CSB-Puffer gewaschen bis die nichtbindende Fraktion eluiert war (Extinktionsmessung bei 254 nm). Anschließend wurde die poly(A)-Fraktion mit LS-Puffer bei 55°C eluiert und die RNA durch Zugabe von 0.1 Vol. 10 M LiCl und 2 Vol. Ethanol über Nacht bei -70°C gefällt. Die Säule wurde schließlich noch mit EB-Puffer bei 55°C eluiert und wieder mit CSB-Puffer equilibriert. Das EB-Eluat wurde verworfen, da es Bestandteile enthielt, die die *in vitro* Translation der im LS-Eluat enthaltenen mRNA-Moleküle inhibierte.

Fraktionierte thermische Elution von poly(A)-RNA:

Um die mRNA-Moleküle nach poly(A)-Kettenlänge zu fraktionieren, wurde die an die Säule gebundene RNA mit LS-Puffer stufenweise bei 25°, 35°, 45° und 55°C eluiert und die einzelnen Fraktionen getrennt aufgearbeitet.

6.4 In vitro Translation im Retikulozytensystem

Es wurde käufliches Retikulozytenlysats (New England Nuclear) verwendet und die Inkubationsbedingungen des Herstellers übernommen (60 min, 37°C). Normalerweise wurden pro Translationsansatz 3 µg Gesamt-RNA oder 0,5 µg poly(A)-RNA eingesetzt (Gesamtansatz = 25 µl). Für die Markierung der Translationsprodukte wurde 1-2 mCi/ml L-[³⁵S]Methionin verwendet (1000-1200 Ci/mMol). Die *in vitro* Translationen wurden teilweise im linearen Bereich durchgeführt, d.h. die Menge an *in vitro* synthetisierten Proteinen war proportional zur eingesetzten RNA-Menge (etwa 0,1-0,5 µg Gesamt-RNA). Meist wurde jedoch im Sättigungsbereich translatiert, da das Proteinsynthesemuster identisch und zudem die Ausbeuten am höchsten waren. Nach Ende der Inkubation wurde der Translationsansatz mit 10 Vol. 80%

Aceton versetzt, 10 min im Eis gehalten, die gefällten Proteine kurz abzentrifugiert (30 sec, 10000 g), getrocknet und im entsprechenden Gelpuffer gelöst. Davon wurden 2 μ l-Aliquots entnommen, die Proteine mit 1 ml 25 % Trichloressigsäure 15 min bei 0°C gefällt und die eingebaute Radioaktivität durch Filtertest und Flüssigszintillationszählung bestimmt.

7. Identifizierung in vitro translatierter Proteine als Tubuline

Es wurde wie bei der Identifizierung der *in vivo* synthetisierten Tubuline vorgegangen, wobei der Translationsansatz ohne eine vorausgegangene Fällung der Proteine direkt mit 10 Vol. PMG-Puffer verdünnt und die Selbstaggregation nach Zusatz von Hirntubulin, wie oben beschrieben, induziert wurde.

8. Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Diese Methode (Heil & Zillig, 1970) wurde gewählt, da die Proteinproben häufig SDS enthielten. Folgende Lösungen wurden benötigt:

Rindereserumalbuminlösung: 2 mg/ml (frisch)

Färbelösung: 0.25 % Amidoschwarz

45 % Methanol

10 % Eisessig

Entfärbelösung: 90 % Methanol

2 % Eisessig

Auflöser: 10 g TCA

80 ml Eisessig

5 ml Ameisensäure

20 ml H₂O

Für die Eichkurve wurden zwischen 2 und 10 µl der Albuminlösung, von der Probe ein entsprechendes Volumen auf einen Celluloseacetatstreifen aufgetragen. Dieser wurde 3 min mit der Färbelösung angefärbt, mit Wasser abgespült und 3 x 7 min in der Entfärbelösung geschüttelt. Danach wurde der Streifen nochmals mit H₂O abgespült, die Proteinflecken ausgestanzt, in Reagenzgläser überführt, mit je 1 ml Auflöser versetzt und 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem die Celluloseacetatstücke gelöst waren, wurde die Extinktion bei 630 nm gemessen. Dabei erreichten die Werte nach etwa 2 min einen stabilen Wert. Die Küvetten wurden mit dem Auflöser gereinigt.

9. Protein - Gelelektrophorese

9.1 SDS-Polyacrylamidgradientengel-Elektrophorese (Lämmli, 1970)

Es wurden meist Plattengele (12 cm x 12 cm x 0.15 cm) mit einem linearen Acrylamidgradienten von 5-20 % verwendet. Die Gellösungen wurden nach dem folgenden Schema hergestellt:

	Trenngel		Obergel
ml	5 %	20 %	3 %
1 M Tris/HCl pH 8.8	5.2	5.2	--
1 M Tris/HCl pH 6.8	--	--	1.36
H ₂ O	7.3	3.8	8.8
60 % Acrylamid -	1.1	4.65	0.6
1.6 % Bisacrylamid			
10 % SDS	0.14	0.14	0.12
5 % TEMED	0.20	0.10	0.12
Ammoniumperoxodisulfat (15 mg/ml)	0.10	0.10	0.40
	$\Sigma = 14 \text{ ml}$	14 ml	11.4 ml

Alle Lösungen bis auf das Ammoniumperoxodisulfat wurden zusammenpipettiert und entgast. Unmittelbar vor dem Füllen des Gradientenmischers wurde das Peroxodisulfat zugegeben.

Die Proben waren in SDS-Extraktionspuffer gelöst und wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0.1 Vol. Probenpuffer versetzt.

SDS-Extraktionspuffer: 0.2 M Tris/HCl pH 7.8

1 % SDS

1 % β -Mercaptoethanol

40 mM DTT

Probenpuffer: 0.0625 M Tris/HCl pH 6.8

5 % β -Mercaptoethanol

2 % SDS

0.005 % Bromphenolblau

60 % Glycerin

Elektrodenpuffer: 0.25 M Tris
 (Stammlösung) 1.92 M Glycin
 0.1 % SDS

 Der pH der Lösung betrug 8.2 und wurde
 nicht weiter nachgestellt. Zum Gebrauch
 wurde diese Lösung 1:10 verdünnt.

Die Gele liefen über Nacht bei 70 V bis der Bromphenolblau-
 marker das Ende des Gels erreicht hatte. Die Anfärbung der
 Gele erfolgte durch 30-minütiges Schwenken in Färbelösung,
 die Entfärbung meist über Nacht.

Färbelösung: 2.2 g Coomassie Blue G-250
 80 ml Eisessig
 500 ml MeOH

 + H₂O ad 1 l.

Entfärbelösung: 7 % Eisessig
 10 % Methanol

Radioaktiv markierte Proteine wurden wie unter 9.3
 beschrieben, fluorographisch sichtbar gemacht.

9.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Auftrennung von Proteinen erfolgte
 in der ersten Dimension durch eine Isoelektrofokussierung
 (IEF) oder eine Nicht-Gleichgewichts-pH-Gradienten-Gel-
 elektrophorese (NEPHGE), und in der zweiten Dimension durch
 eine SDS-Polyacrylamidgradientengelelektrophorese (9-20 %).
 IEF- und NEPHGE-Gele wurden als Röhrchengele (8 cm x 0.2 cm
 oder 12 cm x 0.2 cm) gefahren und in folgender Weise
 hergestellt (O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977):

	für 10 ml Gellösung	
	IEF-Gele	NEPHGE-Gele
28.4 % Acrylamid,	1.33 ml	1.33 ml
1.6 % Bisacrylamid		
Harnstoff	5.5 g	5.5 g
10 % Nonidet P-40	2 ml	2 ml
Ampholine (verschiedene	0.5 ml	0.5 ml
pH-Bereiche)	(80 % pH 3.5-10, 10 % pH 8-9.5, 5 % pH 5-7, 5 % pH 4-6)	(pH 3.5-10)
H ₂ O	2 ml	2 ml
TEMED	7 μ l	14 μ l
10 % Ammoniumpersulfat	10 μ l	20 μ l

Die Gelproben wurden in Lysispuffer gelöst, in einem Volumen von 10-100 μ l aufgetragen und mit 20 μ l Probenüberschichtungspuffer überschichtet.

Lysispuffer: 9 M Harnstoff
2 % NP-40
5 % β -Mercaptoethanol

Probenüberschichtungspuffer: 8 M Harnstoff
1 % Ampholine (0.8 % pH 5-7,
0.2 % pH 3.5-10)

Elektrophoresebedingungen für IEF:

Anodenpuffer: 0.01 M H₃PO₄ (unteres Reservoir)
Kathodenpuffer: 0.02 M NaOH (oberes Reservoir)
Laufzeit: begonnen wurde mit 0.17 mA/Röhrchen, bis die Spannung 400 V erreicht hatte; Fortsetzung der Elektrophorese mit konst. 400 V (16.5 h insgesamt), anschließend 1 h bei 800 V.

Elektrophoresebedingungen für NEPHGE:

Anodenpuffer: 0.01 M H_3PO_4 (oberes Reservoir)

Kathodenpuffer: 0.02 M NaOH (unteres Reservoir)

Laufzeit: 4.5 h bei 500 V

Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension:

Nach Ende der Elektrophorese wurden die Gele aus den Röhrchen entfernt und für 15-30 min in 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 2.3 % SDS, 0.0625 M Tris/HCl pH 6.8 geschwenkt, oder für den späteren Gebrauch darin eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Gele wurden anschließend für die Auftrennung in der zweiten Dimension auf einem SDS-Gradientengel verwendet.

Trenngel: 9-20 % Acrylamid (17 cm x 22 cm); Herstellung wie bei den eindimensionalen Gelen beschrieben.

Obergel: 4.75 % Acrylamid

0.1 % SDS

0.125 M Tris/HCl pH 6.8

0.5 M Harnstoff .

Das Röhrchengel wurde direkt auf das polymerisierte Obergel gelegt und mit 1%iger Agarose, die bereits Coomassie Blau G-250 als Marker enthielt, stabilisiert. Radioaktiv markierte Produkte wurden wie unten beschrieben fluorographiert.

9.3 Fluorographie von radioaktiv markierten Proteinen und Auswertung der Fluorogramme

Die zu analysierenden Proteine enthielten für die eindimensionale Gelelektrophorese etwa 1×10^5 dpm ($0.045 \mu\text{Ci}$) und für die zweidimensionale Auftrennung $3-4 \times 10^5$ dpm ($0.135 - 0.180 \mu\text{Ci}$ [^{35}S]Methionin). Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in 10 % TCA, 10 % Eisessig, 30 % Methanol fixiert und zweimal je 15 min in DMSO entwässert. Anschließend wurde es 2-3 h in einer 20%igen Lösung von PPO in DMSO geschüttelt und das vom Gel aufgenommene PPO durch mehrstündiges Schütteln in H_2O ausgefällt. Das Gel wurde auf einem Whatman 3 MM Chromatographiepapier unter Vakuum getrocknet und 2-4 Tage exponiert. Um zu gewährleisten, daß die Filmschwärzung proportional zur Radioaktivität war, wurde der Röntgenfilm mit einem Elektronenblitzgerät unter Verwendung eines Orangefilters sensibilisiert ($\text{OD}_{600} = 0.15$; Laskey & Mills, 1975), und bei -70°C exponiert.

Die Fluorogramme wurden durch Übereinanderlegen von gemeinsamen Spots mittlerer und hoher Intensität verglichen, was auf Grund der guten Reproduzierbarkeit in den meisten Fällen einwandfrei möglich war. Um die Identität von zwei Proteinspezies nach elektrophoretischen Kriterien zu belegen, wurde Mischgele gefahren.

10. Isolierung eines sporulationsspezifischen cDNA Clons

Aus sporulierenden Plasmodien (14-15 h nach Induktionsbeginn, gegen Ende der Kulminationsphase) wurde poly(A)-RNA isoliert und davon eine doppelsträngige cDNA Präparation hergestellt. Diese wurde durch Homopolymerligation in die Pst I Schnittstelle des Plasmids pBR 322 integriert und damit der *Escherichia coli* Stamm RR 1 transformiert (Villa-Komaroff et al., 1978; Peacock et al., 1981). Das Plasmid pBR 322 enthält Resistenzgene für Ampicillin und Tetracyclin, die ein transformiertes Bakterium gegen beide Antibiotika resistent machen. Die Pst I Schnittstelle liegt im Ampicillingen, wodurch eine Insertion an dieser Stelle zur Inaktivierung des Gens führt. Ampicillin negative und Tetracyclin positive Transformanden wurden daher isoliert und durch differentielle Hybridisierung mit radioaktiv markierter poly(A)-RNA aus sporulierenden und Kontrollplasmodien untersucht. Kolonien, die nur mit der RNA aus sporulierenden Zellen ein Signal gaben, wurden näher charakterisiert.

10.1 cDNA Synthese, Einbau in das Plasmid pBR 322 und Transformation von *E. coli*

10.1.1 Synthese des ersten cDNA Stranges

Die Synthese wurde mit AMV-Reverser Transkriptase und oligo-dT₁₂₋₁₈ durchgeführt (Retzel et al., 1980).

AMV-RT Puffer:	Stammlösungen	Gebrauchslösung
	1 M Tris/HCl pH 8.3	40 μ l
	250 mM MgCl ₂	32 μ l
	2 M KCl	40 μ l
	10 mM dATP	80 μ l
	10 mM dTTP	80 μ l
	10 mM dGTP	80 μ l
	10 mM dCTP	80 μ l
	0.5 mg/ml oligo dT ₁₂₋₁₈	96 μ l
	H ₂ O	4 μ l
		$\Sigma = 480 \mu$ l

Reaktionsansatz: 90 μ l AMV-RT Puffer
 15 μ l RNasin (250 Einheiten)
 20 μ g poly(A)-RNA (vorher 2 min
 auf 70°C erhitzt und im Eis
 abgekühlt)
 10 μ Ci [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mMol)
 4 μ l Reverse Transkriptase
 (40 Einheiten)

 $\Sigma = 150 \mu$ l

Endkonzentrationen: 50 mM Tris
 10 mM MgCl₂
 100 mM KCl
 1 mM Nukleotide
 0.06 mg/ml oligo(dT)₁₂₋₁₈

Inkubationsbedingungen: 60 min/42°C, anschließend
 Zugabe von 150 µl 5 mM Tris/HCl
 pH 8.3, 5 µl 1 M DTT, 30 Einheiten
 Reverse Transkriptase.
 Der Ansatz wurde erneut für 60 min
 bei 45°C inkubiert und in Eis
 gestellt.

10.1.2 Synthèse des zweiten cDNA Stranges (ds-cDNA) und Abbau des "Hairpinloops"

Die Reaktionslösung der Erststrangsynthese wurde für 3 min
 gekocht und sofort in Eis gekühlt. Die Synthese des zweiten
 Stranges wurde mit dem Klenow Fragment der DNA-Polymerase I
 von E. coli durchgeführt (Retzel et al., 1980)

DNA-Polymerase I

Reaktionspuffer: für 300 µl: 20 µl 10 mM dATP
 20 µl 10 mM dGTP
 20 µl 10 mM dTTP
 200 µl 1 M HEPES pH 6.9
 40 µl 2 M KCl

 dCTP wurde separat
 zugegeben

Reaktionsansatz: 300 µl Reaktionsansatz für 1. Strang
 46 µl DNA-Pol. I Reaktionspuffer
 30 µCi [³H]dCTP
 (30 Ci/mMol, getrocknet)
 3.5 µl 10 mM dCTP
 50 Einheiten DNA-Polymerase I

 Σ = 350 µl

Inkubationsbedingungen: 6 h bei 15°C

Der Reaktionsansatz wurde zentrifugiert und der Überstand über eine Sephadex G-50 Säule gegeben, um die Nukleotide abzutrennen. Die Ausbeute an ds-cDNA betrug 4.8 μg , das sind 12 % bezogen auf das Ausgangsmaterial (Berechnungen erfolgten anhand der eingebauten Radioaktivität). Nach Fällung wurde die doppelsträngige cDNA in 40 μl TE-Puffer gelöst.

Abbau des "Hairpinloops" durch die Nuklease S_1

Die Reaktion wurde unter verschiedenen Bedingungen und Nukleasemengen ausgetestet und die DNA auf alkalischen Agarosegelen (1.4 %) analysiert.

S_1 -Reaktionspuffer (10x): 2 M NaCl
 0.5 M Na-Acetat pH 4.5
 10 mM ZnSO_4
 5 % Glycerin

Reaktionsansatz: 5 μl ds-cDNA (0.6 μg)
 3 μl S_1 -Reaktionspuffer
 1 μl Nuklease S_1 (10 Einheiten)
 21 μl H_2O

 $\Sigma = 30 \mu\text{l}$

Inkubationsbedingungen: 11 min bei 37°C
 15 min bei 20°C

Die Reaktion wurde durch Zusatz von 3 μl 100 mM EDTA gestoppt. Nach zweimaliger Extraktion mit Phenol/ CHCl_3 wurde die DNA mit 0.1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5 und 2.5 Vol. Ethanol gefällt (30 min/-70°C), und in 10 μl TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute an ds-cDNA betrug 0.48 μg (ausgehend von 0.6 μg).

10.1.3 Anfügen von homopolymeren Enden ("Tailing") an die ds-cDNA, das Plasmid pBR 322 und Durchführung der Homopolymerligation.

Die Reaktion wurde mit Terminaler Desoxynukleotidyltransferase durchgeführt, und die genauen Reaktionsbedingungen durch die Aufnahme von Kinetiken mit der durch Hae III geschnittenen DNA des Phagen Φ X-174 ermittelt. Die ds-cDNA wurde mit dCTP, das Plasmid mit dGTP verlängert (Efstratiadis & Villá-Komaroff, 1979).

Terminale Transferase

Reaktionspuffer (10x): 2 M Kalium-Cacodylate
250 mM Tris/HCl pH 6.9

Reaktionsansatz: 10 μ l ds-cDNA (0.48 μ g
bzw. 3.6 μ g pBR 322
20 μ l Term. Transf. Puffer
20 μ l 10 mM CoCl_2
20 μ l 1 mM dCTP bzw. dGTP
20 μ l Gelatine (1 mg/ml)
107 μ l H_2O
2 μ l 10 mM DTT
1 μ l [α - ^{32}P]-dCTP (10 μCi)
1 μ l Terminale Desoxynukleotidyl-
transferase (15 Einheiten)

 $\Sigma = 200 \mu\text{l}$

Inkubationsbedingungen: 5.5 min bei 37°C
(ergab 16 Mol dCTP's bzw.
22 Mol dGTP's pro Mol Ende)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l 500 mM EDTA pH 8.0 gestoppt. Es folgte eine Phenolextraktion und anschließend eine Reextraktion der phenolischen Phase mit 50 μ l TE-Puffer. Die Nukleinsäuren wurden aus den wässrigen Phasen

gefällt und in 40 μ l TE-Puffer gelöst.

Homopolymerligation ("Annealing") von cDNA und Plasmid

Das Plasmid und die cDNA, beide mit entsprechenden Homopolymerenden versehen und in jeweils 20 μ l TE-Puffer gelöst, wurden mit je 180 μ l "Annealing"-Puffer verdünnt, auf 65°C erhitzt und gemischt. Der Ansatz wurde 10 min bei 65°C, 2 h bei 56°C inkubiert und anschließend über mehrere Stunden auf 30°C abgekühlt. 40 μ l dieses Ansatzes wurden direkt für die Transformation verwendet, der Rest wurde mit t-RNA als Carrier ausgefällt und in 20 μ l TE-Puffer gelöst.

"Annealing"- Puffer: 200 mM NaCl

10 mM Tris/HCl pH 8.0

1 mM EDTA

10.1.4 Transformation von E. coli

Für die Transformation wurde der E. coli Stamm RR 1 (ein $recA^+$ Stamm) verwendet, von dem bekannt ist, daß seine Transformationseffizienz für homopolymerligierte Plasmide zehnmal höher ist als beim $recA^-$ Stamm HB 101 (Peacock et al., 1981).

Herstellung kompetenter Zellen:

Die Zellen aus einer Kultur mit der OD_{600} von 0.5 wurden abzentrifugiert (10 min, 2°C, 1500 g) und in 40 ml Transformationspuffer I resuspendiert.

Transformationspuffer I: 10 mM NaCl

25 mM Tris/HCl pH 7.5

Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (10 min, 2°C,

1500 g), in 20 ml Transformationspuffer II resuspendiert, 30 min auf Eis gestellt und wie angegeben zentrifugiert.

Transformationspuffer II: 50 mM CaCl_2
 20 mM NaCl
 25 mM Tris/HCl pH 7.5

Der Zellniederschlag wurde nun in 1 ml 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris/HCl pH 7.5 suspendiert (0°C) und 400 μl davon mit 40 μl aus dem ursprünglichen Homopolymerligationsansatz (= 0.1 pMol ds-cDNA) gemischt und 30 min in Eis gestellt. Die Zellen wurden anschließend für 2 min bei 42°C "geschockt", mit 2.6 ml Wachstumsmedium versetzt und 45 min bei 37°C geschüttelt. Jeweils 200 μl wurden pro Agarschale (15 mg/l Tetracyclin) ausplattiert. Zwei auf diese Weise durchgeführte Transformationen ergaben schließlich 1056 Clone, die auf Tetracyclin, nicht aber auf Ampicillin wuchsen (etwa 80 % aller Kolonien).

10.2 Selektion eines sporulationsspezifischen Clons

Clone, die ein cDNA-Stück einer sporulationsspezifischen mRNA trugen, wurden durch differentielle Koloniehybridisierung (Grunstein & Hogness, 1975) mit radioaktiv markierter RNA aus Kontroll- und induzierten Plasmodien nachgewiesen.

10.2.1 Koloniehybridisierung mit endmarkierter poly(A)-RNA

Die einzelnen Kolonien wurden auf Agarplatten mit Tetracyclin gezüchtet und jeweils 88 Kolonien wurden mit einem Stempel auf Nitrocellulosefilter von 8 cm Durchmesser, die auf Agarplatten lagen, übertragen und 6 h bei 37°C inkubiert (Grunstein & Hogness, 1975). Die NC-Filter wurden anschließend nacheinander auf 3 MM Filterpapiere gelegt, die mit folgenden Lösungen getränkt waren:

10 % SDS	5 min
0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl	10 min
0.5 M Tris/HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl	5 min
2x SSPE	5 min

Die Filter wurden 60 min luftgetrocknet, und dann 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken. Danach wurden sie kurz auf 6x SSC Lösung gelegt, 5 min untergetaucht und schließlich 1 h bei 42°C in Waschpuffer inkubiert.

Waschpuffer: 1 M NaCl
1 mM EDTA
0.1 % SDS
50 mM Tris/HCl pH 8.0

Jeweils drei Filter wurden mit 5-6 ml Hybridisierungslösung 4-8 h bei 42°C vorhybridisiert, und anschließend wurde die radioaktive Hybridisierungsprobe mit einer Spritze injiziert und die Hybridisierung für 48 h bei 42°C durchgeführt.

Hybridisierungslösung: 50 % Formamid
5x Denhardt's Lösung
5x SSPE
0.1 % SDS
100 µg/ml Halobakterien DNA
150 µg/ml polyA

50x Denhardt's Lösung: 1 % BSA
1 % Ficoll Typ 400
1 % Polyvinylpyrrolidon

Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter zweimal 5 min mit 2x SSC bei Raumtemperatur und zweimal 30 min mit 1x SSC, 0.1 % SDS bei 68°C gewaschen, getrocknet und wie unter 15.4 beschrieben exponiert.

Radioaktive Markierung von RNA:

Als Hybridisierungsprobe wurde mit Polynukleotidkinase endmarkierte poly(A)-RNA aus Kontroll- und induzierten Plasmodien verwendet, die folgendermaßen hergestellt wurde:

5x Kinasepuffer: 250 mM Tris/HCl pH 9.0

50 mM $MgCl_2$

25 mM DTT

5 % Glycerin

Reaktionsansatz: 10-20 μg poly(A)-RNA

5 μl 5x Kinasepuffer

+ H_2O ad 25 μl ; 1 min auf 100°C
erhitzt und sofort in Eis gestellt.

5 μl 5x Kinasepuffer

30-60 μCi [γ - ^{32}P]-ATP (3000 Ci/mMol)

16 Einheiten Polynukleotidkinase

+ H_2O ad 50 μl

Inkubationsbedingungen: 30 min bei 37°C

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl 0.5 M EDTA pH 8.0 gestoppt, die Nukleotide mittels Zentrifugation durch eine Sephadex G-25 Säule (1 ml) abgetrennt und die RNA in 50 % Formamid, 5x SSPE der Hybridisierungslösung zugesetzt.

11. Isolierung von Plasmiden

11.1 Miniplasmidpräparation (Birnboim & Doly, 1979)

Puffer A: 50 mM Glucose
 25 mM Tris/HCl pH 8.0
 10 mM EDTA

Puffer B: 0.2 N NaOH
 1 % SDS

Puffer C: 60 ml 5 M K-Acetat
 11.5 ml Eisessig

 ad 100 ml.

1.5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden in einer Eppendorffzentrifuge 1 min abzentrifugiert, der Zellschlag in 100 μ l Puffer A resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 150 μ l Puffer B und 5-minütiger Inkubation im Eis wurden 120 μ l eiskalter Puffer C zugesetzt und die Mischung nach mehrmaligem Stürzen 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich je einmal mit 1 Vol. Phenol und CHCl_3 extrahiert, durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol 2 min bei Raumtemperatur gefällt, 2 min zentrifugiert, zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ l TE-Puffer gelöst. Zum Schluß erfolgte eine RNase-Behandlung durch Zusatz von 2.5 μ g RNase A und Inkubation für 10 min bei 56°C. Die Nukleinsäuren wurden ausgefällt und für Restriktionsanalysen im entsprechenden Puffer aufgenommen.

11.2 Plasmidisolierung im großen Maßstab (Birnboim & Doly, 1979)

Puffer A,B,C: wie unter 11.1.

Die Plasmide einer 2 l-Kultur mit einer OD_{600} von 0.6 wurden durch Zugabe von 150 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol über Nacht amplifiziert und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4000 g, 4°C). Der Zellschlag wurde in 40 ml Puffer A (5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von 80 ml Puffer B wurde die Lösung durch vorsichtiges Stürzen gemischt und 10 min in Eis gestellt. Schließlich wurde die chromosomale DNA durch Zugabe von 60 ml eiskaltem Puffer B und 10-minütiger Inkubation bei 0°C ausgefällt und abzentrifugiert (20000 rpm, TFA 20-Rotor, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, die Plasmid-DNA nach Zugabe von 0.6 Vol. Isopropanol 15 min bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert (30 min, 12000 g), getrocknet, in 30 ml TE-Puffer gelöst und über zwei CsCl-Gradienten gereinigt. Dazu wurde die Plasmidlösung mit CsCl (1 g/g Lösung) und Ethidiumbromid (500 $\mu\text{g/ml}$) versetzt und 40 h bei 40000 rpm in einem Ti 60 Rotor zentrifugiert. Die Plasmidbande wurde seitlich abgenommen, noch einmal unter denselben Bedingungen rezentrifugiert, wieder seitlich abgenommen, 1:1 mit TE-Puffer verdünnt und viermal mit TE-Puffer-gesättigtem Isobutanol extrahiert. Nach Fällung mit 2.5 Vol. Ethanol über Nacht bei 4°C wurde der Niederschlag in 1 ml TE-Puffer gelöst und von der Lösung ein UV-Spektrum aufgenommen.

12. Charakterisierung sporulationsspezifischer cDNA-Clone

12.1 Restriktionsanalyse

Die aus verschiedenen Kolonien isolierten Plasmide wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen gespalten und auf 1-2%igen Agarosegelen (siehe Kap. 13) analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß sämtliche analysierten Plasmide eine etwa 700 Basenpaare große Deletion zwischen der Pst I- und der Eco R I-Schnittstelle (inklusive) des pBR 322 aufwiesen. Deshalb wurden die insertierten cDNA-Stücke jeweils mit Pst I und Hind III herausgeschnitten. Für die Längenbestimmung der Inserts wurden 2%ige Agarosegele gefahren.

12.2 In vitro Translation hybrid-selektionierter mRNA-Spezies

20 µg Plasmid aus einem sporulationsspezifischen cDNA-Clon wurden in 40 µl H₂O gelöst, 10 min auf 100°C erhitzt und sofort im Eis abgekühlt. Anschließend wurden 40 µl 1 M NaOH zugesetzt, die Mischung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und nacheinander mit 40 µl 1 M NaCl, 0.3 M Trinatrium-Citrat, 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 und 40 µl 1 M HCl versetzt, gemischt und in Eis gestellt. Diese Lösung wurde nun in 5 µl-Portionen auf 3x3 mm große Nitrocellulosefilter unter leichtem Vakuum aufgetragen. Der Filter wurde luftgetrocknet, 2x mit je 25 ml 6x SSC bei Raumtemperatur gewaschen und wieder 1 Stunde luftgetrocknet. Nach zweistündigem Backen bei 80°C in einem Vakuumofen wurde der Filter in 1 ml H₂O getaucht, 1 min bei 100°C inkubiert, ins Eis gestellt, das Wasser abgesaugt und noch einmal mit 1 ml H₂O bei Raumtemperatur gewaschen. Die Hybridisierung

des filtergebundenen Plasmids mit isolierter poly(A)-RNA wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Parnes et al., 1981):

Hybridisierungslösung: 400 µg/ml poly(A)-RNA

65 % Formamid

20 mM Pipes pH 6.4

0.2 % SDS

0.4 M NaCl

100 µg/ml poly(A)

10 min auf 70°C erhitzt und

60 µl pro Filter eingesetzt.

Inkubationsbedingungen: 3 h bei 50°C

Die Hybridisierungslösung wurde abgesaugt und der Filter 10x mit je 1 ml 10 mM Tris/HCl pH 7.6, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % SDS bei 65°C und 2x mit demselben Puffer ohne SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Der Filter wurde nun in ein frisches Eppendorfggefäß überführt, welches 10 µg t-RNA in 100 µl H₂O gelöst enthielt, und 1 min bei 100°C inkubiert. Nach sofortigem Abkühlen auf -70°C wurde die Lösung wieder aufgetaut, der Filter herausgenommen, die Lösung mit 1 Vol. Phenol/CHCl₃ 1:1 extrahiert und die RNA durch Zugabe von 0.2 Vol. 10 M LiCl und 3 Vol. Ethanol 20 min bei -70°C gefällt. Die gefällte RNA wurde abzentrifugiert (10 min, 10000 g), 1x mit 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 2.5 µl H₂O gelöst und direkt für die in vitro Translation verwendet.

13. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

13.1 RNA-Elektrophorese im sauren Agarose-Harnstoffgel

Diese Gele dienten vor allem der Beurteilung, inwieweit die isolierte RNA intakt war, bevor sie *in vitro* translatiert wurde. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß die ribosomalen Banden nicht degradiert waren. Ein 1.5%iges Gel setzte sich folgendermaßen zusammen (Rosen et al., 1975):

Puffer A: 0.25 M Citronensäure

Puffer B: 0.25 M Citronensäure
0.5 M β -Alanin pH 3.6

Gellösung (für 150 ml): 2.25 g Agarose
33.5 ml H₂O

Die Mischung wurde kurz aufgekocht und wieder abgekühlt.

100 ml 9 M Harnstoff
11.25 ml Puffer A
3.75 ml Puffer B
1.5 ml 10 % SDS

Das Gel (15 x 15 x 0.2 cm) wurde als vertikales Plattengel gegossen und vor der Verwendung mindestens 4 h im Kühlschrank aufbewahrt.

Elektrophoresepuffer: 25 mM Citronensäure
50 mM β -Alanin
0.1 % SDS

Probenpuffer: 2 mg/ml Xylencyanblau
 2 mg/ml Bromphenolblau
 2 mg/ml Orange G
 1 mM EDTA pH 3.6
 50 % Sucrose

Die Proben, gelöst in 10 μ l, wurden mit 1 Vol. Formamid versetzt, 5 min auf 75°C erhitzt, abgekühlt, mit 2 μ l eines 4+1 Gemisches aus Puffer A und B und 2 μ l Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 18 h lang bei 4°C mit 5 V/cm durchgeführt. Vor der Anfärbung mit Ethidiumbromid wurde das Gel für 30 min in einen neutralen Puffer gelegt.

13.2 RNA-Elektrophorese in Formaldehyd-Agarosegelen

Es wurden 1.5%ige und 2%ige Gele in einer Flachgelapparatur (20x20 cm) gefahren (Lehrach et al., 1977) und auf folgende Weise hergestellt: Die Agarose wurde in entsprechender Konzentration in H₂O aufgeköcht, auf 60°C abgekühlt, mit 5x Gelpuffer und Formaldehyd versetzt (Endkonzentration: 1x bzw. 2.2 M) und auf 200 ml mit H₂O aufgefüllt. Das Gel wurde sofort gegossen.

Gelpuffer: 0.2 M MOPS pH 8.0
 50 mM Na-Acetat
 5 mM EDTA

Elektrophoresepuffer: wie Gelpuffer, aber pH 7.0

Probenpuffer: 1x Gelpuffer
 2.2 M Formaldehyd
 50 % Formamid
 0.4 % Bromphenolblau
 0.4 % Xylencyanblau

Laufzeit: 900 V·h

Die in H_2O gelöste RNA (bis zu 30 μg) wurde mit 4 Vol. Probenpuffer verdünnt, 15 min auf 55°C erhitzt und aufgetragen. Die Verbindung zwischen Elektrophoresepuffer und Gel wurde durch 2 Lagen Whatman 3 MM Papier hergestellt. Vor dem Anfärben mit Ethidiumbromid (4 $\mu g/ml$ 1x Gelpuffer, 2 h) wurde das Gel 5 min in H_2O gelegt. Sollte die RNA anschließend auf Nitrocellulose übertragen werden, wurde das Gel nicht angefärbt.

13.3 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese von DNA

Es wurden ausschließlich 1-2%ige Flachgele mit einer Größe von 20x20 cm verwendet (Loening, 1969). Die Agarose für ein Gel wurde in 180 ml H_2O aufgeköcht, auf etwa 60°C abgekühlt, mit 20 ml 10x Loening-Puffer versetzt und in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Apparatur mit 2 l 1x Loening-Puffer gefüllt, bis der Puffer etwa 2 mm über der Geloberfläche stand. Der Kamm wurde entfernt und die Proben aufgetragen. Das Gel lief über Nacht mit 70 mA, bis der Bromphenolblaumarker die Hälfte bzw. das untere Drittel des Gels (je nach Konzentration der Agarose) erreicht hatte. Als DNA-Molekulargewichtsmarker wurde eine mit Hind III geschnittene DNA des Phagen λ verwendet. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (2 $\mu g/ml$) 20 min angefärbt und unter einer UV-Lampe betrachtet und fotografiert.

Loening-Puffer: 0.36 M Tris/Essigsäure pH 7.8

0.3 M NaH_2PO_4

0.01 M Na_2 -EDTA

13.4 DNA-Elektrophorese in alkalischen Agarosegelen (McDonnell et al., 1977)

Die Agarose wurde in entsprechender Konzentration in 200 ml 50 mM NaCl, 1 mM EDTA aufgekocht, auf 50°C abgekühlt und in einer Flachgelapparatur gegossen (McDonnell et al., 1977). Die Apparatur wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt, bis der Puffer 2-3 mm über der Geloberfläche stand und 30 min stehen gelassen. Danach wurden die in Probenpuffer gelösten Proben aufgetragen.

Elektrophoresepuffer: 30 mM NaOH
1 mM EDTA

Probenpuffer: 50 mM NaOH
1 mM EDTA
2.5 % Ficoll Typ 400
0.4 % Bromphenolblau

Laufzeit: 300 V·h

Die radioaktiv markierten Proben wurden sichtbar gemacht, indem das Gel nach Beendigung der Elektrophorese 30 min in 7%ige Trichloressigsäure gelegt, in Plastikfolie eingeschweißt und autoradiographiert wurde.

14. Isolierung von chromosomaler DNA aus *Physarum polycephalum*

Im ersten Schritt wurden Kerne isoliert und aus ihnen die DNA angereichert.

14.1 Isolierung von Kernen

Der entscheidende Reinigungsschritt bestand in der Zentrifugation der Kerne durch einen Percoll-Gradienten (Hildebrand & Nothacker, unveröffentlichte Ergebnisse). Für die Aufarbeitung wurden folgende Lösungen verwendet:

Kernmedium (10x): 150 mM MgCl_2
 20 mM Pipes pH 7.5
 50 mM EGTA
 5 M Hexylenglycol
 10 % Surfynol

 Der pH wurde mit HCl bzw. NaOH
 eingestellt.

Percoll-Gradientenlösung: 90 ml Percoll
 10 ml 10x Kernmedium
 156 ml 1x Kernmedium

 = 35 % Percoll (v/v)

Makroplasmodien wurden samt Filter in eiskaltes H_2O getaucht, abgekratzt, einmal mit H_2O bei 4°C gewaschen und in 140 ml 1x Kernmedium pro 10 Plasmodien aufgenommen. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenso bei 4°C . Die Zellen wurden nun in einem Braun Mixer 20 sec auf Stufe 1 und im Falle von hungernden Plasmodien weitere 4 min auf Stufe 3, im Falle von Wachstumsplasmodien 30 sec auf Stufe 3 homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat durch 2 Lagen mit 1x Kernmedium befeuchteter Milchfilter (Hacorapid, Hartmann, BRD) filtriert und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (5 min, 2000 rpm). Der Niederschlag (ausgehend von 7-10 Plasmodien) wurde in 0.5 ml 1x Kernmedium aufgenommen, mit 9.5 ml Gradientenlösung gemischt und zentrifugiert (15 min, 5°C , 23000 g, ohne Bremse). Die Kernbande wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, einmal

mit 5 ml 1x Kernmedium gewaschen und in 1.5 ml 1x Kernmedium (pro 10 Plasmodien) suspendiert. Davon wurde ein Aliquot entnommen, 1:10 verdünnt und in einer Zählkammer (nach Neubauer) ausgezählt. Die Ausbeute betrug zwischen 10^7 und 10^8 Kerne pro Plasmodium. Die Kerne wurden in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C gelagert.

14.2 DNA-Isolierung aus Kernen

Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 8.0
 50 mM EDTA
 0.5 % Na-Laurylsarkosinat
 0.5 mg/ml Proteinase K

10^8 bis 10^9 Kerne wurden in 5 ml Puffer A vorsichtig suspendiert im Wasserbad 2 h bei 37°C gerührt und zentrifugiert (10 min, 12000 g). Der Überstand wurde dreimal mit Phenol und einmal mit CHCl_3 bei Raumtemperatur vorsichtig extrahiert (je 10 min). Die DNA wurde durch Zugabe von 0.1 Vol. 10 M LiCl und 2.5 Vol. Ethanol 30 min bei -70°C gefällt und über Nacht im Kühlschrank in 5 ml TE-Puffer gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ribonuklease A (10 min bei 80°C vorbehandelt) für eine Stunde bei 80°C inkubiert, je einmal mit Phenol und CHCl_3 extrahiert, gefällt und in TE-Puffer gelöst.

14.3 DNA-Bestimmung mit Diphenylamin (Giles & Myers, 1965)

Folgende Lösungen wurden benötigt:

Diphenylaminreagenz: 4 % Diphenylamin in Eisessig

Acetaldehydlösung: 1.6 mg/ml in H_2O

DNA-Eichlösung:

Stammlösung: 0.3 mg/ml Heringsperma DNA in
5 mM NaOH

Arbeitslösung: Die Stammlösung wurde 1:1 mit
10 % HClO_4 verdünnt und 20 min
bei 70°C inkubiert.

1 ml einer Zellsuspension wurde 1:1 mit 1 ml 10 % HClO_4 verdünnt und 20 min bei 70°C inkubiert. Die Lösung wurde auf 30°C abgekühlt mit 2 ml (1 Vol.) Diphenylaminreagenz und 100 μl Acetaldehydlösung versetzt und 15-18 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm und 700 nm gemessen und der entgültige Wert durch Subtraktion der Extinktion bei 700 nm von der bei 595 nm bestimmt.

15. Hybridisierung von an Nitrocellulose gebundenen Nukleinsäuren

15.1 Bindung von RNA an Nitrocellulose ("Northern blot"; Thomas, 1983)

Die RNA wurde in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und das Gel nach der Elektrophorese je 5 min in H_2O und 10x SSC gelegt (keine Ethidiumbromidanfärbung!). Ein Teflonblock, mit 2 Lagen Whatman 3 MM Papier umwickelt, wurde in eine 2 cm hoch mit 10x SSC angefüllte Schale gelegt. Sobald das Papier gleichmäßig befeuchtet war, wurde das Gel aufgelegt und mit einem in 2x SSC getränkten Nitrocellulosefilter gleicher Größe bedeckt. Darüber kamen zwei mit 2x SSC befeuchtete Lagen Whatman 3 MM Papier und mehrere Lagen Zellstoff. Das Ganze wurde mit einem Bleiblock beschwert. Der Transfer wurde nach etwa 20 h beendet, die Nitrocellulose abgenommen und 2 h bei 80°C im Vakuumofen

gebacken.

Hybridisierungsbedingungen:

Der Filter wurde mit $75 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ Hybridisierungspuffer mindestens 5 h bei 42°C vorhybridisiert. Anschließend wurde eine in Gegenwart von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ nukleotiden nick-translatierte Plasmid-DNA in TE-Puffer gelöst, 10 min auf 100°C erhitzt, rasch abgekühlt, mit 1 Vol. Formamid versetzt und als Hybridisierungsprobe zugegeben. Der Ansatz wurde für 48 h bei 42°C inkubiert.

Hybridisierungspuffer: 50 % Formamid

5x Denhard's Lösung

5x SSPE

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Halobakterien DNA

Nach Ende der Hybridisierung wurde der Nitrocellulosefilter viermal 5 min mit 2x SSC bei Raumtemperatur und zweimal 15 min mit 0.1x SSC bei 50°C gewaschen, getrocknet und autoradiographiert.

15.2 Transfer von DNA auf Nitrocellulose ("Southern blot"; Southern, 1975)

Nachdem das DNA-Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt war, wurde es in folgenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge inkubiert:

- 2 x 7 min in 0.25 M HCl (nur 1x 7 min bei Restriktion mit Hpa II, Msp I, Mbo I und Sau 3AI)
- 2 x 20 min in 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
- 2 x 15 min in 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris/HCl pH 7.5

Beim Wechsel von verschiedenen Lösungen wurde das Gel zuerst mit Wasser abgespült.

Der Transfer der DNA auf die Nitrocellulose wurde wie für die RNA beschrieben durchgeführt. Es wurde lediglich 20x SSC statt 10x SSC verwendet. Der Nitrocellulosefilter wurde ebenfalls 2 h bei 80°C im Vakuum gebacken.

Hybridisierungsbedingungen:

Die NC-Filter wurden mindestens 5 h mit der Hybridisierungslösung vorhybridisiert, bevor die nick-translatierte DNA-Probe wie beschrieben zugegeben wurde. Der Hybridisierungsansatz wurde 48 h bei 42°C inkubiert.

Hybridisierungslösung: 50 % Formamid
 5x Denhard's Lösung
 5x SSPE
 0.3 % SDS
 100 µg/ml Halobakterien DNA
 30 µl Antifoam A auf 10 ml

Der NC-Filter wurde schließlich zweimal 5 min mit 2x SSPE bei Raumtemperatur und zweimal 30 min mit 0.2x SSPE, 0.1 % SDS bei 65°C gewaschen, getrocknet und autoradiographiert.

15.3 Radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation (Maniatis et al., 1975)

Reaktionsansatz: 20 µl 5x NT-Puffer
 5 µl E. coli DNA-Polymerase I
 (25 Einheiten)
 50-100 µCi [α -³²P]-dNTP
 1-2 µg Plasmid-DNA

 + H₂O ad 100 µl

5x NT-Puffer: 0.5 M Tris/HCl pH 7.5
50 mM $MgCl_2$
500 μM der 3 übrigen nicht
radioaktiv markierten dNTP's

Inkubationsbedingungen: 3 h bei 18°C

Nach Ende der Inkubation wurde der Reaktionsansatz durch eine Sephadex G-50 Säule (1 ml) zentrifugiert, um die freien Nukleotide zu entfernen.

15.4 Autoradiographiebedingungen für ^{32}P

Der Röntgenfilm X-ray 90 (Linhardt, BRD) wurde, wie unter 9.3. beschrieben, sensibilisiert und unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Trimax) mit den Nitrocellulosefiltern bei -70°C exponiert.

VI. LITERATUR

- Anderson, R.W. (1977) A plasmodial colour mutation in the myxomycete *Physarum polycephalum*; Genet. Res. 30, 301-306.
- Apel, K. (1979) Phytochrome-induced appearance of mRNA activity for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (*Hordeum vulgare*); Eur. J. Biochem. 97, 183-188.
- Baeckmann, A. (1980) Bestimmung der Sequenzkomplexität der poly(A)-RNA von *Physarum polycephalum*. Ein Beitrag zum Verständnis der Regulation der Genexpression bei Eukaryonten; Doktorarbeit, Universität Würzburg, Deutschland.
- Betina, V. & Zajacova, J. (1978) Inhibition of photoinduced *Trichoderma viride* conidiation by inhibitors of RNA synthesis; Folia Microbiol. 23, 460-464.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; Nucleic Acids Res. 7, 1513-1517.
- Borisy, G.G. & Olmsted, J.M. (1972) Nucleated assembly of microtubules in porcine brain extracts; Science (Wash. D.C.) 177, 1196-1197.
- Burland, T.G., Gull, K., Schedl, T., Boston, R.S. & Dove, W.F. (1983) Cell type-dependent expression of tubulins in *Physarum*; J. Cell Biol. 97, 1852-1859.
- Chantrenne, H. (1977) Oocyte injection; Nature 269, 202.

Chapman, A. & Coote, G. (1982) Sporulation competence in *Physarum polycephalum* CL and the requirement for DNA replication and mitosis; J. Gen. Microbiol. 128, 1489-1501.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease; Biochemistry 18, 5294-5299.

Cooke, D.J. & Dee, J. (1975) Methods for the isolation and analysis of plasmodial mutants in *Physarum polycephalum*; Genet. Res. (Camb.) 24, 175-187.

Dale, R.M.K., Livingstone, D.C. & Ward, D.C. (1974) The synthesis and enzymatic polymerization of nucleotides containing mercury: potential tool for nucleic acid sequencing and structural analysis; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2238-2242.

Daniel, J.W., Rusch, H.P. (1962) Method for inducing sporulation of pure cultures of the myxomycete *Physarum polycephalum*; J. Bacteriol. 83, 234-240.

Daniel, J.W. & Baldwin, H.H. (1964) Methods of culture for plasmodial myxomycetes. In: Methods in Cell Physiology, ed. Prescott, D.M. (Academic, New York), Vol. 1, 9-41.

Daniel, J.W. (1966) Light-induced synchronous sporulation of a myxomycete. In: Cameron and G.M. Padilla, eds., Cell Synchrony, pp. 117-152. Academic Press, New York.

Dentler, W.L., Granett, S. & Rosenbaum, J.L. (1975) Ultrastructural localization of the high molecular weight proteins associated with in vitro assembled brain microtubules; J. Cell Biol. 65, 237-241.

DeFabo, E. (1980) On the nature of the blue light receptor: still an open question; In: The Blue Light Syndrome, ed. Senger, H., Springer Verlag, pp. 187-197.

Efstratiadis, A. & Villa-Komaroff (1979) Cloning of double-stranded DNA. In: Genetic engineering (ed. J.K. Setlow and A. Hollaender), vol. 1, p. 15. Plenum Press, New York.

Evans, H.H. & Evans, T.E. (1970) Methylation of the deoxyribonucleic acid of *Physarum polycephalum* at various periods during the mitotic cycle; J. Biol. Chem. **245**, 6436-6441.

Fränkel-Conrat, H., Singer, B. & Tsugita, A. (1961) Purification of viral RNA by means of bentonite; Virology **14**, 54-58.

Giles, K.W. & Myers, A. (1965) An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid; Nature **206**, 93.

Gollmer, I. & Apel, K. (1983) The phytochrome-controlled accumulation of mRNA sequences encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (*Hordeum vulgare*); Eur. J. Biochem. **133**, 309-313.

Goodman, E.M., Sauer, H.W., Sauer, L. & Rusch, H.P. (1969) Polyphosphate and other phosphorus compounds during growth and differentiation of *Physarum polycephalum* Can. J. Microbiol. **15**, 1325-1331.

Gressel, J. (1980) Blue light and transcription. In: Senger H. (ed) The blue light syndrome. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 133-155.

Grunstein, M. & Hogness, D.S. (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965.

Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F., Sackagucki, K. (1981) Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid associated killer character; J. Bacteriol. 145, 382-390.

Hatano, S., Ōwaribe, K., Matsumura, F., Hasegawa, T. & Takahashi, S. (1979) Characterization of actin, actinin and myosin isolated from *Physarum*; Can. J. Bot. 58, 750-759.

Heil, A. & Zillig, W. (1970) Reconstitution of bacterial DNA-dependant RNA-Polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription; FEBS 11, 165-168.

Hoffmann, W. and Hüttermann, A. (1975) Amino-peptidases of *Physarum polycephalum*. Activity, isoenzyme patterns and synthesis during differentiation; J. Biol. Chem. 250, 7420-7427.

Hundrieser, J. & Richter, G. (1982) Blue light induced synthesis of ribulosebisphosphate carboxylase in cultered plant cells; Plant Cell Rep. 1, 115-118.

Hüttermann, A., Porter, M.T. & Rusch, H.P. (1970) Activity of some enzymes in *Physarum polycephalum*. II. During spherulation (differentiation); Arch. Mikrobiol. 74, 283-291.

Jacobson, M.F. & Baltimore, D. (1968) Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 77-84.

- Jokusch, B.M., Sauer, H.W., Brown, D.F., Babcock, K.L. & Rusch, H.P. (1970) Differential protein synthesis during sporulation in the slime mold *Physarum polycephalum*; J. Bacteriol. **103**, 356-363.
- Kantor, J.A., Turner, P.H. & Neinhuis, A. (1980) Beta thalassaemia: Mutations which affect processing of the β -globin mRNA; Cell **21**, 149-157.
- Kislev, N. & Chet, I. (1973) Scanning electron microscopy of sporulating cultures of the myxomycete *Physarum polycephalum*; Tissue and Cell **5**, 349-357.
- Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Kuhn, D.N. & Hahlbrock, K. (1983) UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 2591-2593.
- Kuo, M.T., Mandel, J.L. & Chambon, P. (1979) DNA methylation: correlation with DNase I sensitivity of chicken ovalbumin and conalbumin chromatin; Nucleic Acids Res. **7**, 2105-2113.
- Laane, M.M. & Haugli, F.B. (1976) Nuclear behavior during meiosis in the myxomycete *Physarum polycephalum*; Norw. J. Bot. **23**, 7-21.
- Laffler, T.G., Chang, M.T. & Dove, W.F. (1981) Periodic synthesis of microtubular proteins in the cell cycle of *Physarum*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 5000-5004.
- Lamb, C.J. & Lawton, M.A. (1983) Photo control of gene expression. In: Encyclopedia of Plant Physiology, eds. Shropshire, W. & Mohr, H. (Springer Berlin), Vol. 16A, pp. 213-257.

Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄; *Nature* **227**, 680-685.

Laskey, R.A. & Mills, A.D. (1977) Enhanced autoradiographic detection of ³²P and ¹²⁵I using intensifying screens and hypersensitized film; *FEBS* **82**, 314-316.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination; *Biochemistry* **16**, 4743-4750.

Loening, U.E. (1969) The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis; *Biochem. J.* **113**, 131-138.

Maniatis, T., Jeffrey, A. & Kleid, D.G. (1975) Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1184-1186.

McCormick, J., Blomquist, J.C. and Rusch, H.P. (1970) Isolation and characterization of a galactosamine wall from spores and spherules of *Physarum polycephalum*; *J. Bacteriol.* **104**, 1119-1125.

McDonnell, M.W., Simon, M.N. & Studier, F.W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels; *J. Mol. Biol.* **110**, 119-123.

Melera, P., Peltz, R., Davide, J.P. & O'Connell, M. (1978) Polyadenylated RNA in the lower eucaryote *Physarum polycephalum*; *Molec. Biol. Rep. Vol. 4*, 4: 229-232.

Miller, O.L. jr. & Beatty, B.R. (1969) Portrait of a gene; *J. cell. Physiol.* **74** (suppl. 1), 225-236.

Nicholls,T.J. (1972) The effects of starvation and light on intramitochondrial granules in *Physarum polycephalum*; J. Cell Sci. 10, 1-14.

O'Farrell,P.H. (1975) High resolution two-dimensional elektrophoresis of protein; J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.

O'Farrell,P.Z., Goodmann,H.M. & O'Farrell,P.H. (1977) High resolution two dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins; Cell 12, 1133-1142.

O'Malley,B.W., Tsai,M.J., Tsai,S.Y. & Towle,H.C. (1977) Regulation of gene expression in chick oviduct; Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 42, 605-615.

Palatnik,C.M., Storti,R.V. and Jacobson,A. (1979) Fractionation and functional analysis of newly synthesized and decaying messenger RNAs from vegetative cells of *Dictyostelium discoideum*; J. Mol. Biol. 128, 371-395.

Parnes,J.R., Velan,A., Felsenfeld,A., Ramanathan,L., Ferrini,U., Apella,E. & Sidman,J.G. (1981) Mouse β_2 microglobulin cDNA clones: A screening procedure for cDNA clones corresponding to rare mRNAs; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2253-2257.

Peacock,S.L., McIver,C.M. & Monohan,J.J. (1981) Transformation of E. coli using homopolymer-linked plasmid chimeras; Biochim. Biophys. Acta 655, 243-248.

Putzer,H., Werenskiold,K., Verfürth,C. & Schreckenbach,Th. (1983) Blue light inhibits slime mold differentiation at the mRNA level; EMBO J. 2, 261-267.

Retzel, E.F., Collet, M.S. & Faras, A.J. (1980) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transcriptase in vitro: Optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates; *Biochemistry* **19**, 513-516.

Rosen, J.M., Woo, S.L.C., Holder, J.W., Means, A.R. & Malley, B.W. (1975) Preparation and preliminary characterization of purified ovalbumin messenger RNA from the hen oviduct; *Biochemistry* **14**, 69-78.

Sauer, H.W., Babcock, K.L. and Rusch, H.P. (1969a) Changes in RNA synthesis associated with differentiation (sporulation) in *Physarum polycephalum*; *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 410-421.

Sauer, H.W., Babcock, K.L. and Rusch, H.P. (1969b) Sporulation in *Physarum polycephalum*. A model system for studies on differentiation; *Exp. Cell Res.* **57**, 319-327.

Sauer, H.W., Babcock, K.L. and Rusch, H.P. (1969c) High molecular weight phosphorus compound in nucleic acid extracts of the slime mold *Physarum polycephalum*; *J. Bacteriol.* **99**, 650-654.

Schreckenbach, Th., Walckhoff, B., Verfürth, C. (1981) Blue-light receptor in a white mutant of *Physarum polycephalum* mediates inhibition of spherulation and regulation of glucose metabolism; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, No.2, 1009-1013.

Schreckenbach, Th. and Verfürth, C. (1982) Blue light influences gene expression and motility in starving microplasmidia of *Physarum polycephalum*; *Eur. J. Cell Biol.* **28**, 12-19.

Sheiness,D. & Darnell,J.E. (1973) Polyadenylic acid segment in mRNA becomes shorter with age; Nature New Biol. **241**,265-268.

Southern,E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis; J. Mol. Biol. **98**, 503-517.

Stavy,R., Galun,E., Gressel,J. (1972) Morphogenesis in Trichoderma: RNA/DNA hybridization studies; Biochim. Biophys. Acta **259**, 321-329.

Thomas,P.S. (1983) Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper; Meth. of Enzymol. **100**, 255-266.

Tsai,S.Y., Tsai,M-J., Schwartz,R.J., Kalimi,M., Clark,J. & O'Malley,B.W. (1975) Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct: nuclear receptor levels and the initiation of transcription; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 4228-4232.

Villa-Komaroff,L., Efstratiadis,A., Broome,S., Lomedico,P., Tizard,R., Naker,S.P., Chick,W.L. & Gilbert,W. (1978) A bacterial clone synthesizing proinsulin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3727-3731.

Weatherall,D.J. & Clegg,J.B. (1979) Recent developments in the molecular genetics of human haemoglobin; Cell **16**, 467-479.

Werenskiold,K. (1982) Zum Einfluß von Licht auf die Proteinsynthese bei *Physarum polycephalum*; Diplomarbeit, Universität München.

Wickner,B.R. (1978) Twenty-six genes needed to maintain the killer doublestranded RNA plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*; *Genetics* **88**, 419-425.

Young,N.S., Benz,E.J., Kantor,J.A., Kretschmer,P. & Neinhuis,A.W. (1978) Hemoglobin switching in sheep: only the γ gene is in the active conformation in fetal liver but all the β and γ genes are in the active conformation in bone marrow; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5884-5888.

VII. Abkürzungen

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
dCTP	Desoxycydidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(aminoethylether)- N,N'-tetraessigsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
h	Stunde
hnRNA	heterogene nukleäre RNA
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethyl- sulfonsäure
kD	Kilodalton
mA	Milliampere
min	Minute
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NEPHGE	Nicht-Gleichgewichts-pH-Gradientengel- elektrophorese
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
Pipes	Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfonsäure
poly(A)	Polyadenylat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-dodecylsulfat

sec	Sekunde
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1981 bis Mai 1984 unter der Leitung von Dr. Th. Schreckenbach am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt.

Herrn Dr. Schreckenbach danke ich sehr herzlich für sein persönliches Interesse an meiner Arbeit, sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Oesterhelt möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. F. Kreuzaler für die Einführung in die cDNA-Clonierung und Frau C. Verfürth für ihre tatkräftige Hilfe bei zahlreichen Experimenten.

Besonders hervorheben möchte ich auch die sehr gute Arbeitsatmosphäre in der Abteilung, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

LEBENS LAUF

Name	Harald Putzer
geboren	4. August 1956
Nationalität	Österreich
Familienstand	ledig
1962 - 1966	Volksschule Bregenz-Mehrerau
1966 - 1974	Bundesgymnasium Bregenz
4.7.1974	Matura
1974 - 1975	Columbia High School, Richland, Wa.
	USA (AFS-Stipendium)
1975 - 1980	Studium der Chemie an der Universität
	Innsbruck und Diplomprüfung
Seit Februar 1981 Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried	
13. Juni 1984	

